



# Desarrollo funcional del sistema córticoestriatal: rol de las vías dopaminérgicas

Galiñanes, Gregorio  
2010

Tesis Doctoral

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Universidad de Buenos Aires

[www.digital.bl.fcen.uba.ar](http://www.digital.bl.fcen.uba.ar)

Contacto: [digital@bl.fcen.uba.ar](mailto:digital@bl.fcen.uba.ar)

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Fuente / source:

Biblioteca Digital de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

## **DESARROLLO FUNCIONAL DEL SISTEMA CÓRTICOESTRIATAL: ROL DE LAS VÍAS DOPAMINÉRGICAS**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el  
área de Ciencias Biológicas

**GREGORIO GALIÑANES**

Director de Tesis: Dr. M Gustavo Murer  
Consejero de Estudios: Dr. Enrique Rodríguez

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Fisiología de Circuitos Neuronales  
Departamento de Fisiología, FMED, UBA

Buenos Aires 2010

# DESARROLLO FUNCIONAL DEL SISTEMA CÓRTICOESTRIATAL: ROL DE LAS VÍAS DOPAMINÉRGICAS

## Resumen

Los ganglios de la base (GB) son núcleos subcorticales involucrados en el control voluntario del movimiento y en procesos mnésicos, atencionales y motivacionales. En los animales adultos, la actividad de estos núcleos depende fuertemente de la dopamina, que regula el flujo de información cortical hacia el estriado, que es el núcleo de "entrada" de los GB. Sin embargo, el conocimiento de la maduración funcional de estos circuitos en el pasaje de la infancia a la adultez y si las vías dopaminérgicas ejercen un rol sobre este proceso, es escaso. Algunas alteraciones conductuales de condiciones neuropsiquiátricas asociadas al desarrollo, como el síndrome de Gilles de la Tourette, el Déficit de Atención con Hiperactividad (ADHD) o el Trastorno Obsesivo Compulsivo, han sido explicadas por alteraciones de la función dopaminérgica y de los circuitos frontoestriatales. Por lo tanto resulta de interés comprender los procesos madurativos normales y patológicos de estos circuitos en relación a las vías dopaminérgicas.

La hipótesis general en la que se enmarca esta tesis es que los circuitos córticoestriatales son inmaduros al momento del nacimiento y que durante la infancia y adolescencia ocurren cambios sustanciales en el conexionado anatómico y funcional que les confieren las características del sistema adulto. En estos procesos madurativos la dopamina jugaría un papel central y la conectividad adquirida durante el desarrollo y moldeada por la experiencia condicionaría las conductas mediadas por los GB. Un corolario de esta hipótesis es que alteraciones postnatales que afecten la conectividad córticoestriatal podrían ser el sustrato de alteraciones conductuales asociadas a patologías de los GB que podrían manifestarse en distintas etapas de la vida.

Para evaluar esta hipótesis trabajamos con un modelo animal de lesión de neuronas dopaminérgicas neonatal y estudiamos las propiedades electrofisiológicas del sistema córticoestriatal en el pasaje de la infancia hacia la adultez. Los resultados obtenidos indican que, comparado con los ratones juveniles, en los ratones adultos la densidad de neuronas estriatales espontáneamente activas decae, la conectividad funcional córticoestriatal aumenta, la probabilidad de respuesta estriatal a estímulos focales en la corteza disminuye y la capacidad de sufrir depresión sináptica córticoestriatal disminuye. Encontramos que algunos de estos procesos madurativos parecen ser facilitados por las vías dopaminérgicas (densidad de sitios activos y resistencia a la LTD), mientras que otros, en apariencia, maduran normalmente en los ratones con lesión neonatal. Estos resultados apoyan la hipótesis de trabajo y sugieren que perturbaciones sobre la neurotransmisión dopaminérgica en etapas tempranas del desarrollo pueden producir efectos duraderos sobre algunas capacidades de los circuitos córticoestriatales mientras que otras pueden madurar gracias a mecanismos compensatorios.

**Palabras Clave:** Dopamina, Corteza Frontal, Estriado, Neurodesarrollo, Enfermedades neuropsiquiátricas, Modelos Animales, Electrofisiología *in vivo*

# FUNCTIONAL DEVELOPMENT OF THE CORTICOSTRIATAL SYSTEM: ROLE OF THE NIGROSTRIATAL DOPAMINERGIC PATHWAYS

## Abstract

Basal Ganglia (BG) are a group of subcortical nuclei involved in voluntary motor control and in some of the mnemonic, attentional and motivational aspects of behaviour. BG activity in adult animals is highly dependent on dopamine which regulates cortical information flow through the striatum, which is the main input nucleus of the BG. However, the current knowledge of the functional development of these circuits during adolescence and whether dopamine pathways are involved in that process is scarce. Some of the behavioural alterations observed in neuropsychiatric disorders, such as Gilles de la Tourette syndrome, Attention/Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) or Obsessive Compulsive Disorder have been attributed to deficiencies in dopaminergic and corticostriatal circuit function. Thus, it is of interest to better understand normal and pathological developmental processes of these circuits in relation to dopamine pathways.

The general hypothesis of this Thesis is that corticostriatal circuits are immature at the time of birth and substantial changes take place during infancy and adolescence at the functional and anatomical level. During this developmental period dopamine would play a key role and the final connectivity of the system acquired through development and sculpted by experience would have an impact on the behaviour sustained by the BG. To assess whether the maturation of corticostriatal functional connectivity is altered by early dopamine depletion, we examined preadolescent and postadolescent urethane-anesthetized mice with or without dopamine-depleting lesions. We specifically studied (1) synchronization between striatal neuron discharges and oscillations in frontal cortex field potentials and (2) striatal neuron responses to frontal cortex stimulation. In adult control mice striatal neurons were less spontaneously active, less responsive to cortical stimulation, and more temporally tuned to cortical rhythms than in infants. Striatal neurons from hyperlocomotor mice required more current to respond to cortical input and were less phase locked to ongoing oscillations, resulting in fewer neurons responding to refined cortical commands. By adulthood some electrophysiological deficits waned other remained substantially elevated whereas others remained. These results are compatible with our working hypothesis and suggest that early disruption of dopaminergic neurotransmission during postnatal development might produce enduring effects over some capacities of the corticostriatal circuits while others might be subject to compensatory mechanisms.

**Key words:** Dopamine, Frontal Cortex, Striatum, Neurodevelopment, Neuropsychiatric disorders,

Animal Models, *in vivo* Electrophysiology.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

Introducción	1
Sección I: Maduración funcional del sistema nervioso central	1
Sección II: Circuitos córticoestriatales y ganglios de la base	5
Sección III: Plasticidad sináptica córticoestriatal	19
Sección IV: Maduración postnatal del sistema córticoestriatal	27
Objetivos e hipótesis	35
Resultados	38
Sección I: Lesión dopaminérgica neonatal. Caracterización del modelo	38
Sección II: Enganche de fase córticoestriatal	49
Sección III: Actividad espontánea estriatal	61
Sección IV: Plasticidad sináptica córticoestriatal	70
Sección V: Canales paralelos córticoestriatales	79
Discusión	88
Refinamiento de los circuitos córticoestriatales durante el desarrollo	88
Establecimiento de los canales paralelos córticoestriatales	90
¿Rol madurativo de las interneuronas?	92
Lesión neonatal como modelo de ADHD	93
Materiales y métodos	96
Modelo experimentales	96
Conducta locomotora	97
Experimentos electrofisiológicos	98
Análisis de señal	105
Histología	109
Citas bibliográficas	112

## INTRODUCCIÓN

### Sección I. Maduración funcional del Sistema Nervioso Central

*Los circuitos cerebrales son inmaduros al momento del nacimiento y son refinados por mecanismos de actividad intrínseca y por efectos del ambiente. Los circuitos inmaduros también son plásticos y por lo tanto vulnerables a procesos que pueden alterar su funcionalidad y resultar en la expresión de conductas aberrantes asociadas a patologías.*

Al momento del nacimiento la organización anatómica de los circuitos cerebrales de los mamíferos presenta características sustancialmente diferentes del cerebro adulto. Por ejemplo, los humanos nacen con una sobreabundancia de contactos sinápticos que en algunas regiones de la corteza pueden llegar a duplicar el número de contactos del cerebro adulto (Huttenlocher y de Courten 1987). Por otro lado, la mielinización aumenta progresivamente durante el desarrollo postnatal de modo tal que el cerebro adulto contiene más sustancia blanca que el cerebro neonatal, que prácticamente carece de ella (Manukian y Kirakosian 1985; Woo y Crowell 2005). Estos ejemplos son evidencia de que los circuitos neuronales del neonato son relativamente inmaduros desde el punto de vista morfológico e indican que durante el desarrollo postnatal deben existir mecanismos que promuevan la maduración de los mismos y, por lo tanto, de las conductas que sustentan.

El proceso de formación de los circuitos cerebrales se puede dividir en dos grandes fases (Goodman y Shatz 1993). La primera comienza durante la etapa embrionaria del desarrollo, que es cuando las neuronas se generan, migran, diferencian y conectan distintas regiones cerebrales entre sí a través de la extensión de procesos axonales. Esta fase es considerada "independiente de actividad" ya que las claves para la diferenciación celular y el crecimiento axonal están dadas por señales moleculares reguladas genéticamente, y puede perdurar en algunas regiones del cerebro hasta bien avanzada la adultez (hipocampo, bulbo olfatorio). Como resultado de esta fase del desarrollo, los circuitos que se establecen presentan un patrón de conectividad relativamente impreciso y estereotipado. Durante la siguiente fase, que comienza en la vida embrionaria y se extiende hasta etapas tardías de la infancia y

aun la adolescencia, los circuitos neuronales sufren cambios plásticos gracias a los cuales la conectividad entre las células es refinada por mecanismos "dependientes de actividad" (Penn y Shatz 1999; Sur y Rubenstein 2005). Los fenómenos que promueven este refinamiento consisten en la elaboración, retracción y remodelado de conexiones sinápticas y son considerados "dependientes de actividad" porque el bloqueo farmacológico de la actividad neuronal impide que se establezcan patrones "normales" de conectividad (Katz y Shatz 1996). Muchos de estos cambios plásticos postnatales, como la sinaptogénesis, el podado sináptico y la mielinización axonal presentan un máximo de actividad durante la infancia o adolescencia y se extienden hasta la adultez temprana, tanto en humanos como en monos y en ratas (Watson y col. 2006).

La plasticidad sináptica de los circuitos neuronales en el cerebro en desarrollo confiere a los individuos una notable capacidad de adaptación al medio. Numerosos ejemplos que sustentan esta hipótesis han sido descritos en distintas especies incluyendo aves y mamíferos. Por ejemplo, determinadas capacidades del cerebro adulto son adquiridas casi de manera excluyente durante etapas tempranas del desarrollo postnatal, como el lenguaje en humanos y el canto en aves, la formación de mapas visuoespaciales y la discriminación sensorial (Knudsen 2004). Una característica de este tipo de procesos es la presencia de un período *crítico* o *sensible* durante el cual los circuitos expresan una máxima capacidad para ser moldeados por la experiencia. Una vez pasado ese período, el sistema pierde parte de su plasticidad y se hace más rígido, limitando también la capacidad de aprendizaje (Knudsen 2004).

En este tren de ideas, también se cree que la misma plasticidad que le confiere a los circuitos cerebrales esta gran adaptabilidad y capacidad de aprendizaje coloca al cerebro en desarrollo en una posición de alta vulnerabilidad. Por ejemplo, el cerebro en desarrollo es más vulnerable que el cerebro adulto a compuestos tóxicos como el litio o el mercurio que pueden causar alteraciones severas que perduran más allá del período de intoxicación (Rodier 1994). La administración de psicoestimulantes (como el metilfenidato) a ratas infantiles genera una respuesta aversiva a la cocaína durante la adultez (Andersen y col. 2002). En conjunto, estos resultados indican no sólo que el cerebro infantil es

aún inmaduro y más vulnerable que el adulto, sino también que factores que actúan en esta etapa de vulnerabilidad pueden producir cambios perdurables en los circuitos neurales.

Resulta razonable, entonces, preguntarse cómo se adquieren las características adultas de los circuitos cerebrales. Un ejemplo clásico en donde se pone de manifiesto la plasticidad neuronal "dependiente de actividad" en la maduración de los circuitos cerebrales es la deprivación monocular durante el período crítico del sistema visual. Este tratamiento produce alteraciones severas en los patrones de segregación de los axones tálamocorticales del núcleo genicular lateral del tálamo hacia la corteza visual y la consecuente pérdida de formación de columnas de dominancia ocular y surgimiento de alteraciones en la percepción visual (Hubel y Wiesel 1965). Trabajos derivados de este experimento seminal permitieron demostrar que la exposición a patrones anormales de actividad neuronal durante el desarrollo puede tener efectos perdurables sobre la conectividad y funcionamiento de los circuitos del cerebro maduro (Penn y Shatz 1999; Luna 2009). Estos resultados resaltan que la actividad neuronal debida a estimulación sensorial parece imprescindible para la correcta constitución de los circuitos neuronales. Es interesante, sin embargo, que aún antes de que aparezca actividad cerebral causada por aferencias sensoriales, la actividad neuronal endógena ya está presente en etapas embrionarias del desarrollo cortical (Blankenship y Feller 2010). En este sentido, la actividad neuronal endógena quizás más prominente es la actividad durante el sueño, que está presente desde antes del nacimiento y ocupa la mayor parte del día en neonatos. Más aún, se cree que la actividad durante el sueño también cumpliría un rol en la consolidación de memorias y aprendizaje sugiriendo que la actividad espontánea endógena cumple un rol a través modificaciones plásticas a nivel de los circuitos neuronales (Stickgold y col. 2001; Hobson y Pace-Schott 2002; Massimini y col. 2009). Por lo tanto los patrones normales de actividad neuronal endógenos junto con los generados por las aferencias sensoriales durante períodos críticos del desarrollo serían necesarios para esculpir los circuitos neuronales y conferir las capacidades computacionales para llevar a cabo las funciones complejas del cerebro adulto (Yuste 1997; Penn y Shatz 1999; Sur y Rubenstein 2005)

En resumen, durante la formación de los circuitos neuronales una combinación de factores ambientales, neurotóxicos o epigenéticos podrían producir perturbaciones sutiles en el conexionado

normal, condicionando habilidades sensoriomotrices, cognitivas y aspectos de la personalidad, o eventualmente modificar de manera sustancial y perdurable dichos circuitos y ser el sustrato de variados desórdenes asociados con el neuro-desarrollo, tales como déficit de aprendizaje (dislexia), del comportamiento (autismo) y algunos tipos de epilepsia (Penn y Shatz 1999). Entonces, esclarecer los principios neurobiológicos de la maduración de los circuitos cerebrales puede ser importante para comprender el origen de diversas condiciones neuropsiquiátricas.

## Sección II. Circuitos córticoestriatales y ganglios de la base

*Alteraciones funcionales de los ganglios de la base pueden dar lugar a las manifestaciones conductuales de algunas patologías neuropsiquiátricas. La anatomía y el funcionamiento de los circuitos córticoestriatales son conocidos en el animal adulto, pero existe evidencia de que su maduración se completa en etapas tardías del desarrollo postnatal. ¿Existe una etapa de vulnerabilidad de los circuitos de los ganglios de la base?*

Las manifestaciones conductuales de algunas patologías asociadas al neuro-desarrollo como la esquizofrenia, el síndrome de Gilles de la Tourette y el déficit de atención con hiperactividad, que comienzan a expresarse durante la infancia o adolescencia pero pueden persistir en el adulto, podrían ser el resultado de un procesamiento anormal de información cortical por parte de los ganglios de la base (GB) asociado a alteraciones de la función dopaminérgica (Castellanos y Tannock 2002; O'Donnell y col. 2002). En estas patologías, cuya etiología no es completamente clara, no se han reportado de manera consistente cambios anatómicos groseros que puedan explicar las alteraciones de la conducta. Actualmente se acepta que una combinación de factores genéticos, ambientales y del desarrollo podría perturbar la formación normal de microcircuitos córticoestriatales. Este tipo de alteraciones no son detectables con las actuales técnicas de imagen, pero podrían ser el sustrato de las manifestaciones conductuales en estas patologías

La anatomía funcional de los GB ha sido ampliamente estudiada en animales adultos y en alguna medida también en humanos. Sin embargo, los procesos de maduración normal durante el desarrollo postnatal, particularmente en el pasaje de la infancia a la adultez, y de qué manera modificaciones de estos procesos pueden impactar sobre la conducta, son fenómenos poco comprendidos en la actualidad. La adolescencia es un período de alta vulnerabilidad asociada a cambios hormonales, conductuales y funcionales que podría ser un punto de inflexión en el que se manifiesten alteraciones originadas en instancias previas del desarrollo (Spear 2000; Paus y col. 2008; Wahlstrom y col. 2010). En esta sección repasamos las características anátomo-funcionales de los GB adultos y revisamos algunos procesos madurativos durante las primeras semanas de vida postnatal.

## Ganglios de la base: Canales paralelos y circuitos espirales

Los GB son un grupo de núcleos subcorticales altamente desarrollados en los mamíferos, que procesan información proveniente de distintas regiones de la corteza y modulan la función de la misma a través de una vía de retroalimentación tálamo-cortical (**Cuadro I.1**).

### Cuadro I.1 Los GB conectan la corteza a través del tálamo formando bucles cerrados

Los GB están formados por un núcleo de "entrada" principal: estriado y núcleo accumbens (en primates caudado-putamen), los núcleos "intermedios": globo pálido (GP o globo pálido externo en primates) y núcleo subtalámico (NST) y los núcleos de "salida": núcleo entopeduncular (EP; en primates globo pálido interno) y sustancia negra parte reticulada (SNpr).

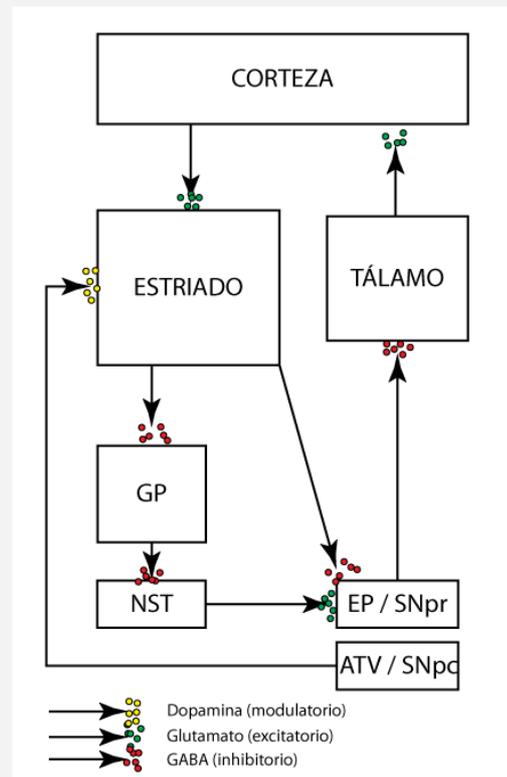
El núcleo principal de entrada recibe aferencias excitatorias glutamatergicas desde la corteza cerebral y desde el tálamo. También es modulado por las vías dopaminérgicas mesencefálicas (ubicadas en la sustancia negra parte reticulada, SNpr, y en el área tegmental ventral, ATV). Los núcleos de salida proyectan principalmente hacia el tálamo ventral y otras regiones subcorticales -como el colículo superior, el núcleo pedúnculo pontino y la formación reticular. Las neuronas de proyección de los núcleos de salida son GABAérgicas y por lo tanto ejercen un efecto inhibitorio sobre las estructuras que inervan. Las neuronas tálamo-corticales son glutamatergicas y ejercen un efecto excitatorio sobre la corteza cerebral.

En condiciones de reposo, las neuronas de los núcleos de salida de los GB muestran una alta tasa de disparo y mantienen, por lo tanto, inhibida la actividad del tálamo, impidiendo la transmisión de información hacia la corteza. Una pausa en la actividad de las neuronas de los núcleos de salida libera al tálamo del tono inhibitorio permitiendo que la actividad de las neuronas tálamo-corticales exciten a la corteza a través de la liberación de glutamato.

Las neuronas del estriado se dividen en dos subpoblaciones que inervan distintos núcleos de los GB y originan de este modo las llamadas vía directa e indirecta. Ambas vías convergen sobre los núcleos de salida de los GB. De acuerdo al modelo clásico, la activación de la vía directa tiene un efecto facilitatorio **sobre la transmisión** tálamo-cortical ya que inhibe a los núcleos de salida de los GB. La vía indirecta, por el contrario, tiene un efecto opuesto, porque un aumento de la actividad en esta vía redundan en un aumento de la actividad de los núcleos de salida.

El rol antagónico de estas dos vías fue interpretado en el marco del control de los movimientos sacádicos oculares y dos modos de actuación fueron propuestos. En el "modo superpuesto" las vías directa e indirecta operan simultáneamente aumentando el contraste "espacial" sobre la actividad de las neuronas tálamo-corticales. Este contraste surge como consecuencia de una inhibición generalizada de las neuronas talámicas por parte de la vía indirecta y de la excitación específica de un pequeño subconjunto de neuronas por parte de la vía directa. En el "modo secuencial", las vías actúan una después de la otra, ejerciendo un contraste "temporal" sobre la actividad talámica. En este modo de acción, la vía indirecta mantendría inhibidas a las neuronas tálamo-corticales hasta el momento en que se desencadena la actividad de la vía directa como consecuencia de un estímulo "gatillo".

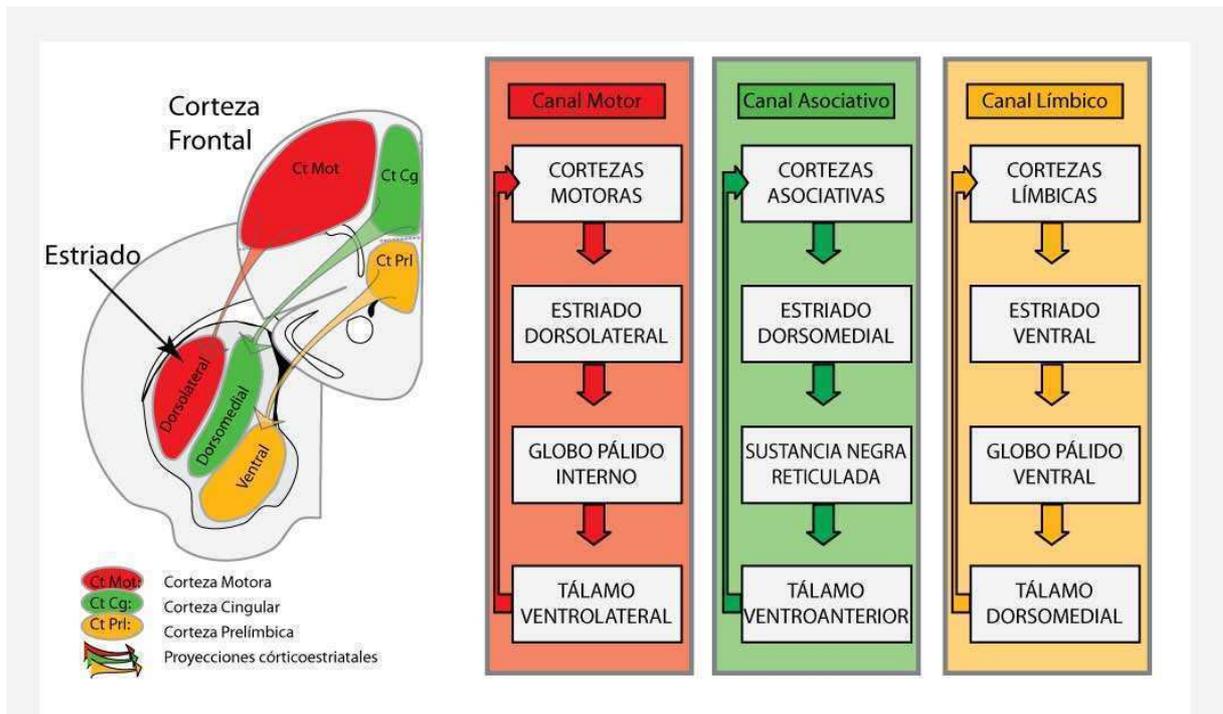
Este modo operacional también ha sido relacionado con la secuenciación de acciones, función atribuida a los GB.



Wichmann y col 1996  
Chevalier y Deniau 1990  
Hikosaka y col 2000  
Graybiel 1998

El principal núcleo de entrada de los GB es el estriado, que recibe aferencias excitatorias provenientes de prácticamente toda la corteza cerebral. Una característica ampliamente aceptada es que las proyecciones corticales hacia el estriado siguen un ordenamiento topográfico, de modo que los axones córticoestriatales de las neuronas de la corteza motora terminan en una región "motora" del estriado, los de las cortezas asociativas en una región "asociativa" y los de las cortezas límbicas en una región "límbica". Este ordenamiento del conexionado córticoestriatal da origen a los **canales paralelos de los GB**, ya que la segregación anatómica se conserva, al menos parcialmente, en las siguientes estaciones de los GB hasta los núcleos de salida y el tálamo. Por último, cada uno de estos circuitos formaría un bucle cerrado ya que las proyecciones tálamocorticales terminan, en términos generales, sobre la misma región cortical donde se originó cada canal (Alexander y col. 1986; Alexander y Crutcher 1990). A partir de evidencia neuroanatómica y funcional, los canales de los GB fueron clasificados de acuerdo a las funciones de la región cortical que les da origen (**Cuadro I.2**).

La consecuencia computacional que sugiere esta organización anatómica es que la información que ingresa a los GB desde las distintas regiones corticales puede ser procesada por el estriado de manera paralela. Sin embargo, a pesar de esta reconocida organización topográfica, la idea de que los canales paralelos están completamente segregados resulta difícil de conciliar con otros hallazgos. Mediante estudios anatómicos y funcionales, se ha observado que áreas corticales funcionalmente relacionadas y anatómicamente interconectadas, proyectan a regiones adyacentes o interdigitadas del estriado, formando un complejo patrón de divergencia y convergencia dentro de los canales córticoestriatales. Por ejemplo, neuronas de la corteza motora y somato-sensorial primarias que representan la misma región corporal establecen proyecciones que convergen sobre la misma región estriatal (Flaherty y Graybiel 1993). Patrones similares de proyección han sido reportados para neuronas de la corteza somato-sensorial primaria y secundaria (Alloway y col. 2000).



**Cuadro 1.2: Canales paralelos y rol de los GB**

Una de las primeras descripciones de los GB asoció sus funciones con el control voluntario del movimiento. Actualmente, es aceptado que los procesos motivacionales y las capacidades cognitivas complejas que guían nuestras respuestas comportamentales son el resultado de las computaciones que realizan los GB sobre la información proveniente de la corteza cerebral. En tal sentido, los GB reciben proyecciones originadas en la mayor parte del neocórtex y también de estructuras límbicas como la amígdala y el hipocampo que mantienen una organización topográfica y dan origen a los canales paralelos.

De acuerdo al sitio cortical donde se originan y a las funciones que cumplen, se ha propuesto la existencia una serie de canales con distintas funciones. Un análisis conservador limitaría el número de canales a tres grandes circuitos, uno "motor", otro "asociativo" o "cognitivo" y otro "límbico". El canal "motor" recibe aferencias de la corteza sensoriomotriz e involucra a las regiones dorsolaterales del estriado (equivalente al putamen en primates) y está involucrado principalmente en procesos motores. El canal "asociativo" recibe aferencias de la corteza prefrontal medial e involucra a la región ventromedial del estriado (equivalente al caudado en primates). El canal "límbico" se origina en la región ventral de la corteza prefrontal, pero también está relacionado con la amígdala basolateral e hipocampo; en este canal está involucrada la región ventral del estriado (también conocida como núcleo accumbens) y está relacionado con los componentes más afectivos de la conducta.

La segregación en canales paralelos se mantiene a lo largo de las siguientes estaciones de los gagglios de la base. Cada canal proyecta sobre una región diferente del tálamo que a su vez envía proyecciones al sitio cortical donde se inició cada canal formando bucles cerrados que conectan a la corteza con los GB. Esta organización anatómica permite a los GB procesar distintos tipos de información de manera paralela

Alexander y col 1986  
Yin y col. 2008, 2009  
Yin & Knowlton 2006  
Dias-Ferreira y col 2009

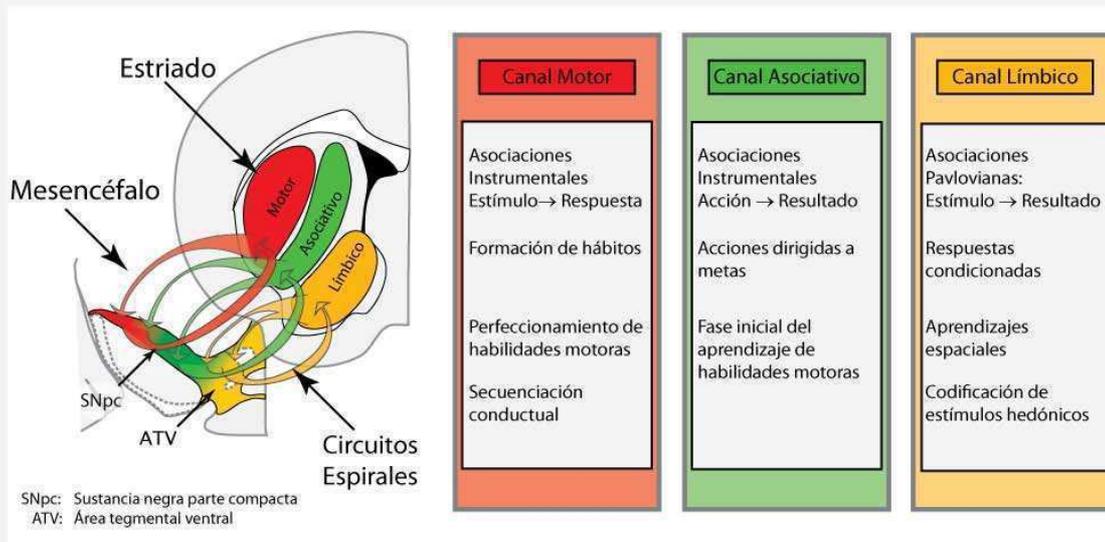
Estos complejos patrones de conectividad permiten la convergencia, sobre una misma región del estriado, de grupos neuronales que se encuentran anatómicamente separados en el mapa cortical, habilitando de esta manera a las neuronas estriatales para procesar e integrar información "multimodal" (Flaherty y Graybiel 1993). Es importante destacar que estos procesos anatómicos no se

limitan únicamente a proyecciones *dentro* el canal sensorio-motor, sino que también ocurren *entre* canales paralelos. Experimentos neuroanatómicos en monos demostraron que fibras corticales provenientes de áreas que corresponderían a distintos canales de procesamiento, como la región dorsolateral prefrontal (perteneciente al canal asociativo) y la región orbitofrontal (canal límbico), ocupan territorios estriatales separados pero también forman parches focales convergentes caracterizados por una alta densidad de terminales corticales (Haber y col. 2006).

Desde un punto de vista teórico y por evidencias clínicas, se acepta que una interacción precisa entre canales paralelos es necesaria para el adecuado funcionamiento de los GB (Hikosaka y col. 1999; Balleine y col. 2009). Además de la evidencia anatómica de convergencia córticoestriatal, estudios fisiológicos recientes demuestran que existe un grado importante de comunicación entre los canales córtico-estriatales, que podría ser la manifestación funcional de la organización anatómica descrita más arriba, y que podría sustentar los fenómenos de integración requeridos por las complejas funciones de estos circuitos (Kasanez y col. 2008).

Sin embargo, también han sido propuestos otros mecanismos de interacción entre canales córticoestriatales que involucran circuitos multisinápticos. Estudios anatómicos recientes han mostrado que los patrones de conexión estriatonigrales y nigroestriatales formarían bucles "espirales" estriato-nigro-estriatales que permitirían conectar de manera "ascendente" las regiones ventromediales con las dorsolaterales del estriado (Redgrave y col. 1999; Haber y col. 2000; Ikemoto 2007). De este modo la actividad del canal "límbico" que involucra la región más ventromedial del estriado podría influir sobre la actividad del canal "asociativo" y éste último sobre la actividad del canal "motor" que corre por la región más dorsolateral del estriado (**Cuadro I.3**).

La compleja organización anatómica de los canales de los GB, entonces, es crucial para que los GB cumplan sus funciones adecuadamente. Sin embargo, el conocimiento actual sobre el establecimiento de los módulos córticoestriatales durante el desarrollo es poco comprendido y resulta por lo tanto de interés comprender más acerca de la maduración de este proceso.



**Cuadro I.3: Aprendizaje en los GB y Circuitos estriato→nigro→estriales**

El normal funcionamiento de los GB implica funciones de aprendizaje y memoria, tales como aprendizajes instrumentales y el condicionamiento pavloviano. Mediante estudios con lesiones químicas y bloqueos farmacológicos ha sido posible asociar regiones acotadas del estriado con cada tipo de aprendizaje. Por ejemplo, el estriado ventral está implicado en asociaciones pavlovianas, mientras que el estriado dorsal está asociado con la adquisición y ejecución de conductas instrumentales. Actualmente se cree que bajo diferentes condiciones, tanto las asociaciones pavlovianas como las instrumentales podrían ocurrir en paralelo durante la adquisición de nuevas conductas. Sin embargo, el control final de la conducta suele estar comandado por uno de los sistemas y por lo tanto resulta de interés comprender cómo es la coordinación entre estos sistemas. Más aún, desde el punto de vista conductual se sabe que las fases iniciales de un aprendizaje instrumental suelen estar gobernadas por un sistema de acciones orientadas a obtener una meta pero luego de un sobre-entrenamiento la conducta puede convertirse en un hábito que se independiza por completo de la obtención de la meta. Ha sido propuesto que la interacción entre los distintos canales responde a una organización jerárquica en la cual cada canal cumple una función lábil e intermedia durante la adquisición de conductas, permitiendo la propagación de información entre los canales.

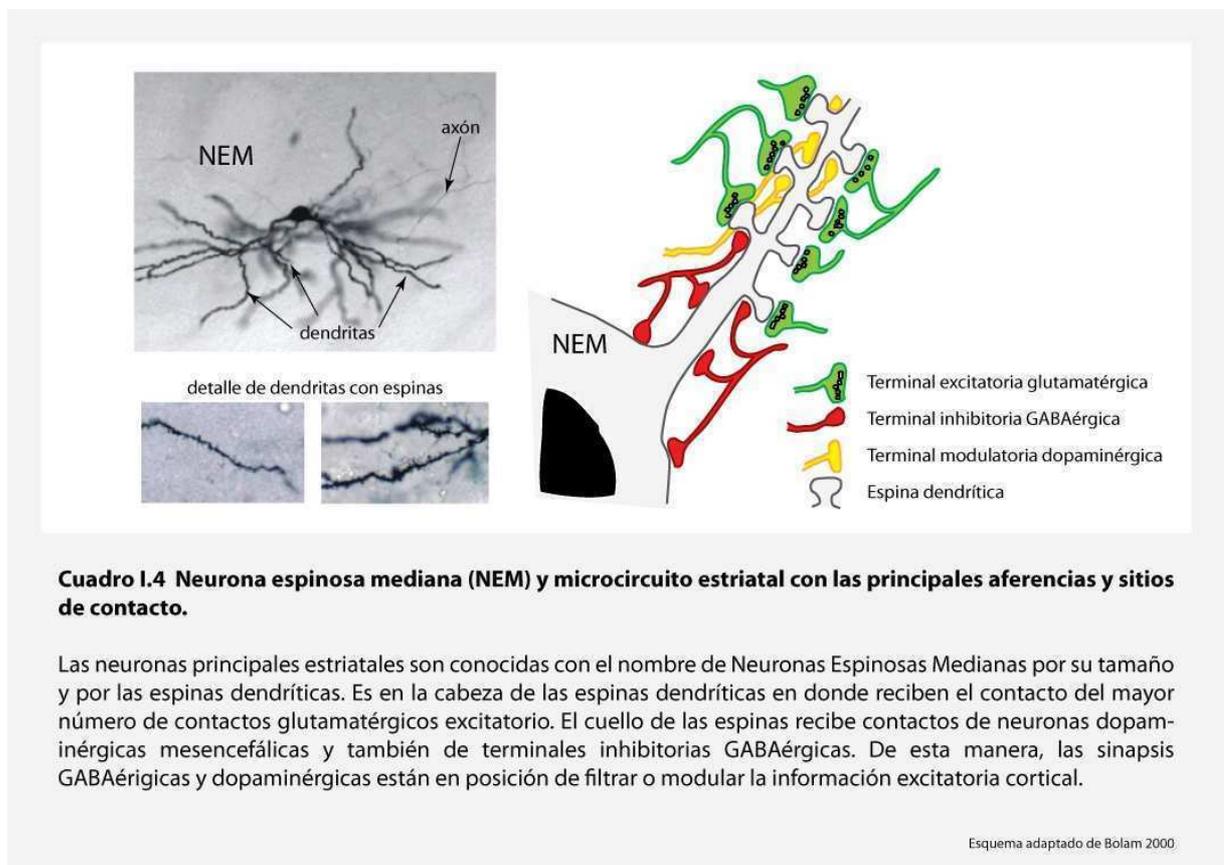
La descripción de conexiones "espirales ascendentes" que conectan de manera serial distintas regiones del estriado podrían ser el sustrato anatómico de esta jerarquía. Las proyecciones que conectan entre sí al estriado con las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas rompen parcialmente con la organización topográfica paralela de los GB. Estas estructuras se conectan a través de conexiones recíprocas que mantienen la organización paralela, pero también presentan no-recíprocas entre el estriado y el mesencéfalo. De esta manera la región ventromedial del estriado recibe proyecciones de neuronas dopaminérgicas ubicadas en la zona medial del mesencéfalo y el estriado envía proyecciones "cerradas" a la misma región mesencefálica pero también envía algunas proyecciones "abiertas" hacia una región mesencefálica más dorsolateral. Esta conectividad se mantiene a lo largo de un eje ventromedial a dorsolateral conectando todos los canales córticoestriales y permitiría que la actividad en el canal límbico influya sobre la actividad del canal asociativo y éste último sobre la del canal motor a través de las vías dopaminérgicas.

Yin y col 2005, 2008  
Joel y Weiner 1999  
Redgrave y col 1999  
Haber y col 2000  
Ikemoto 2007

### *Microcircuito estriatal.*

El estriado está constituido aproximadamente por un 95% de neuronas GABAérgicas de proyección llamadas neuronas espinosas medianas (NEMs) que se conectan entre sí a través de colaterales

axonales inhibitorias y reciben el mayor volumen de contactos sinápticos córticoestriatales. Las NEMs también reciben aferencias dopaminérgicas mesencefálicas, glutamatérgicas del tálamo y serotoninérgicas del rafe dorsal, cuyo rol sería modular la información proveniente de la corteza (Smith y col. 1998). El microcircuito estriatal se completa con un pequeño número de interneuronas GABAérgicas y colinérgicas, que a pesar de ser pocas en cantidad, gracias a sus extensas arborizaciones axonales, podrían ejercer un fuerte control sobre la actividad estriatal y coordinar la actividad entre áreas alejadas del estriado (**Cuadro I.4**)



Una característica morfológica que le da el nombre a las neuronas principales del estriado es la alta densidad de espinas dendríticas presente en las neuronas de animales adultos (4 a 6 espinas por micrómetro) ubicadas en la porción distal del árbol dendrítico. El árbol dendrítico de una NEM ocupa una región aproximadamente esférica de unos 500 micrones de diámetro (Wilson y Groves 1981; Wilson 1993). Las cabezas de las espinas dendríticas reciben terminaciones glutamatérgicas

córticoestriatales y el cuello de las espinas forma sinapsis con terminales dopaminérgicas nigroestriatales (Bolam y col. 2000). Las entradas glutamatérgicas corticales son la principal aferencia excitatoria del estriado y la ubicación anatómica de las sinapsis dopaminérgicas las pone en posición privilegiada para modular la entrada de información cortical.

De acuerdo al número de dendritas y de espinas se ha estimado que cada NEM recibe entre 5000 y 15000 sinapsis corticales, mientras que cada axón córticoestriatal inerva una vasta región del estriado estableciendo muy pocos contactos con cada NEM (Zheng y Wilson 2002). A diferencia de las fibras corticoestriatales, que tendrían efectos espacialmente bien localizados, una única fibra dopaminérgica puede establecer varios contactos en una misma dendrita y con diversas neuronas estriatales, indicando que la especificidad de la modulación dopaminérgica sería más fuerte en la dimensión temporal que en la espacial (Groves y col. 1994; Schultz 2002). Esta organización sináptica sería el sustrato anatómico que permite al estriado procesar información del valor de la recompensa (“reward”) durante la realización de tareas ya que las NEMs podrían codificar asociaciones entre señales del sistema dopaminérgico relativas al valor de la recompensa y claves ambientales provenientes de las proyecciones córticoestriatales (Schultz y col. 1993).

Algunas características electrofisiológicas de las NEMs son consistentes con las propiedades anatómicas del microcircuito. Por ejemplo, la particular relación anatómica entre los axones córticoestriatales y los árboles dendríticos de las NEMs parece reflejarse funcionalmente, ya que la estimulación eléctrica de una región focal de la corteza evoca potenciales postsinápticos de muy baja amplitud. Este hecho sumado a la baja excitabilidad de la membrana, condujo a pensar que la activación de cada NEM requiere una descarga altamente sincronizada de un número elevado de neuronas corticales (Wilson y col. 1992). Mediante el registro *in vivo* simultáneo de la actividad cortical y del potencial de membrana de las NEMs fue posible demostrar que la descarga de potenciales de acción estriatales es generada durante despolarizaciones fuertes del potencial de membrana coincidentes con potenciales corticales de alta potencia (Mahon y col. 2001; Tseng y col. 2001). La fuerte relación entre la actividad cortical y de las NEMs se ve reflejada también en la dinámica del potencial de membrana. Durante las fases profundas del sueño normal o bajo anestesia la

actividad eléctrica de la corteza presenta oscilaciones de alta amplitud y baja frecuencia, conocidas como “onda lenta” (Steriade 2000). En esta condición fisiológica, el potencial de membrana de las NEMs oscila entre dos estados de polarización distintos: un estado más hiperpolarizado o estado *down* (-80 a -90 mV) y un estado más despolarizado o estado *up* (aproximadamente -60 mV). Esta oscilación del potencial de membrana tiene una frecuencia de alrededor de 1 Hz y ocurre de manera coherente con la actividad de onda lenta cortical (Mahon y col. 2001; Tseng y col. 2001). La descarga de potenciales de acción estriatales ocurre durante la llamada “fase activa” de la onda lenta cortical, que corresponde a la fase en la que las neuronas corticales descargan potenciales de acción (Kasanetz y col. 2006). La interrupción espontánea o inducida del ritmo de onda lenta cortical se refleja en el potencial de membrana de las NEMs, ya que desaparece la alternancia entre los estados *up* y *down* y el potencial de membrana se fija en valores comparables a los del estado *up* (Mahon y col. 2001; Kasanetz y col. 2002).

Las transiciones entre el estado *up* y *down* dependen, entonces, de la entrada de información excitatoria cortical ya que, por ejemplo, en rodajas de estriado en donde las aferencias corticales están cortadas, los estados *up* no se desarrollan espontáneamente (Wilson 1993) . Los estados *up* son considerados eventos habilitadores para el procesamiento de información ya que es el único estado en que las NEMs pueden descargar potenciales de acción. Sin embargo, a pesar de que cada estado *up* dura varios cientos de milisegundos y que el potencial de membrana está muy cerca del umbral, la probabilidad de descarga de las NEMs es muy baja. Más aún, en animales anestesiados o en estado de reposo, la descarga espontánea de potenciales de acción de las NEMs es muy baja o nula. En este estado conductual es posible observar esporádicamente disparos espontáneos de trenes de potenciales de acción que posteriormente se silencian. Por el contrario, durante la ejecución de movimientos las NEMs son “reclutadas” y su actividad aumenta notablemente (Schultz y Romo 1992).

En general, debido a las propiedades anátomo-funcionales de las NEMs, se cree que estas neuronas filtran la información irrelevante que llega al estriado en forma desincronizada (ruido) pero que responden frente a entradas corticales altamente sincronizadas que representarían información relevante para el sistema (Wilson 1993; O'Donnell y Grace 1995; Charpier y col. 1999; Kasanetz y

col. 2006). En este sentido, la tasa de descarga y la precisión temporal de los disparos de las neuronas estriatales son menores que las de las neuronas corticales, reforzando la idea de que las NEMs son activadas de manera muy selectiva y sugiriendo que la actividad de las NEMs es altamente dependiente de la estructura espacio-temporal de las entradas corticales (Mahon y col. 2001; 2004). Sin embargo, la regulación precisa de la probabilidad de disparo de las NEMs durante la despolarización de la membrana no ha sido completamente dilucidada.

Aunque parece bastante claro que existe una interacción entre el glutamato y la dopamina en la regulación espacio-temporal de la actividad de las NEMs, no es del todo claro cómo la dopamina ejercería este rol (Rolls y col. 1984; DeFrance y col. 1985). Por ejemplo, la lesión experimental de neuronas dopaminérgicas nigroestriatales en animales adultos, utilizada como modelo de la enfermedad de Parkinson, produce una transferencia exagerada de la actividad cortical sobre las neuronas estriatales aumentando significativamente la tasa de descarga (Tseng y col. 2001). Sin embargo, la pregunta acerca de si el rol de la dopamina como neurotransmisor es excitatorio o inhibitorio es de larga data.

Experimentos electrofisiológicos *in vivo* determinaron que el efecto de la dopamina sobre las neuronas estriatales puede ser tanto un aumento como una disminución de la descarga de potenciales de acción (Kitai y col. 1976; Mercuri y col. 1985). En este sentido, las neuronas estriatales expresan dos tipos de receptores dopaminérgicos distintos (receptores D1 y D2) cuya estimulación produce efectos antagónicos y podrían explicar las diferencias observadas. Sin embargo, la complejidad del sistema aumenta, ya que las neuronas dopaminérgicas pueden descargar potenciales de acción de manera tónica manteniendo un nivel basal de dopamina en el estriado, pero también pueden aumentar su tasa de descarga elevando de manera fásica la concentración extracelular de dopamina (Suaud-Chagny y col. 1992). Además, las interneuronas estriatales también expresan receptores dopaminérgicos, de modo que la dopamina puede actuar en el dominio temporal y en múltiples niveles del dominio espacial del circuito estriatal modulando la función de las neuronas estriatales principales y de la red intraestriatal de interneuronas (Calabresi y col. 2007).

### *Maduración del circuito córticoestriatal.*

Las propiedades anatómicas, morfológicas y funcionales de los circuitos estriatales que presentamos hasta el momento provienen de descripciones realizadas principalmente en ratas y monos adultos. Sin embargo, las características morfológicas y funcionales de las neuronas estriatales y las propiedades de los circuitos córticoestriatales durante etapas tempranas del desarrollo postnatal no son tan bien comprendidas. Existen muy pocos estudios dedicados a la maduración de estos circuitos y confirman que las neuronas estriatales no alcanzan un aspecto anátomo-funcional maduro sino hasta varias semanas después del nacimiento (Tepper y col. 1998).

De manera semejante a los cambios plásticos que involucran formación y remodelado sináptico en la maduración postnatal de estructuras cerebrales como la corteza, las sinapsis córticoestriatales muestran cambios morfológicos significativos que tienen su máxima expresión durante la infancia de las ratas. En las dos primeras semanas postnatales, las dendritas de las NEMs tienen un aspecto relativamente delgado y presentan varicosidades, pero prácticamente carecen de las espinas típicas de las NEMs adultas. Las espinas son la principal estructura del cerebro que recibe neurotransmisión excitatoria; consistentemente con la ausencia de espinas, los contactos sinápticos con fibras corticales durante esta etapa del desarrollo son escasos en las NEMs inmaduras. Entre la tercera y la cuarta semana de vida, el aspecto varicoso de las dendritas va desapareciendo y el número de espinas aumenta en paralelo con el número de conexiones córticoestriatales, hasta alcanzar valores adultos entre la quinta y sexta semana de vida. El mayor número de conexiones excitatorias córticoestriatales –y también tálamoestriatales– se establece durante la segunda y tercera semana de vida postnatal y luego disminuye alcanzando valores adultos (Butler y col. 1998). Sin embargo en esta etapa del desarrollo los aspectos ultramicroscópicos de las sinapsis axo-espinosas y axo-dendríticas aún son inmaduros, sugiriendo que las propiedades funcionales de las sinapsis córticoestriatales todavía no han terminado de madurar (Sharpe y Tepper 1998; Tepper y col. 1998).

En este sentido, las propiedades electrofisiológicas intrínsecas de las NEMs, como la resistencia de entrada, la duración del potencial de acción y potencial de reposo de la membrana se encuentran bien

desarrolladas hacia la tercera semana postnatal. Por el contrario, las propiedades extrínsecas, que dependen de las aferencias corticales, como la respuesta a la estimulación eléctrica y el patrón de descarga de potenciales de acción maduran una o dos semanas más tarde. El potencial de reposo de la membrana presenta valores relativamente despolarizados durante las primeras semanas de vida y hacia la tercera semana alcanza valores comparables al adulto. Sin embargo, la aparición de los estados up y *down* característicos de las NEMs adultas ocurre a partir de la tercera semana de vida alcanzando un aspecto maduro a partir de la cuarta semana, es decir, hacia el final de la infancia. Respecto de la actividad supraumbral, ha sido reportado que no se observa la descarga espontánea de potenciales de acción anteriormente al día postnatal 15 y que a partir de entonces la frecuencia de disparo de las neuronas aumenta gradualmente hasta los 28 días de edad (Napier y col. 1985; Tepper y col. 1998). La aparición de los estados up y *down* y la aparición de actividad espontánea evidencian que las sinapsis córticoestriatales serían funcionalmente activas hacia la tercera y cuarta semana de vida (Tepper y col. 1998).

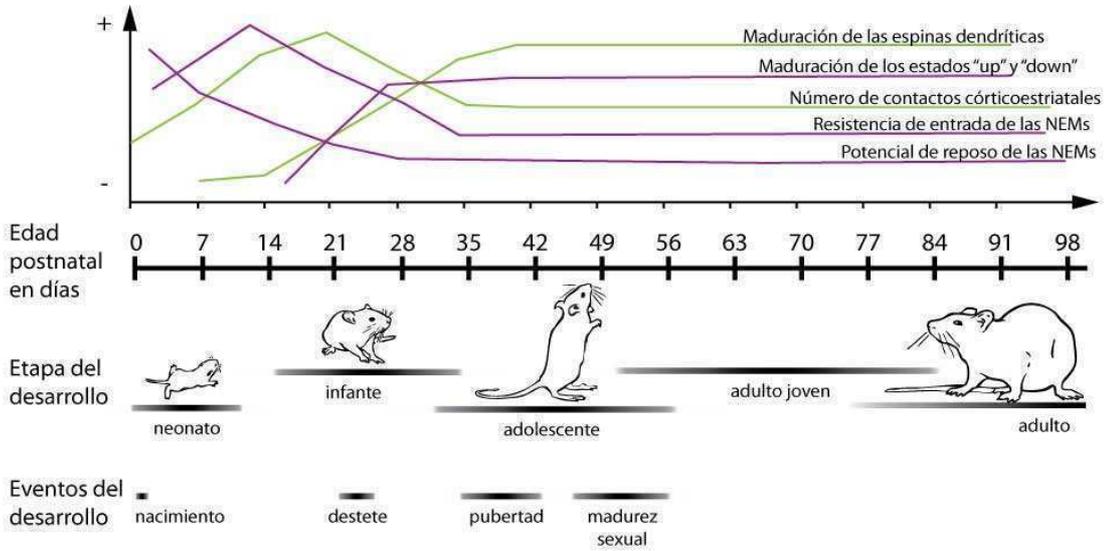
Al igual que las proyecciones córticoestriatales, la innervación dopaminérgica nigroestriatal se desarrolla en las últimas etapas embrionarias y no completa su maduración sino hasta un tiempo después del nacimiento (Voorn y col. 1988; Snyder-Keller 1991). Durante las primeras dos semanas postnatales, la proyección nigroestriatal adquiere el aspecto morfológico característico del adulto (Voorn y col. 1988). La innervación dopaminérgica del estriado ocurre con anterioridad a la llegada de las proyecciones córticoestriatales, cuya arborización axonal ocurre primero en los sitios de innervación dopaminérgica más densa (Nisenbaum y col. 1998). Este hecho refleja la fuerte relación existente entre ambos fenómenos sinaptogénicos y por lo tanto ha sido propuesto que la dopamina cumpliría un rol importante en el desarrollo estriatal (Graybiel 1984; Voorn y col. 1988). De hecho, ha sido demostrado que las aferencias dopaminérgicas están involucradas en la modulación de las características morfológicas de las neuronas estriatales ya que la dopamina estimularía el crecimiento y la arborización de neuritas (Meredith y col. 1995; Schmidt y col. 1996).

Es interesante destacar que no todas las neuronas estriatales tardarían el mismo tiempo en madurar. Las interneuronas GABAérgicas presentarían una morfología semejante a la de animales maduros

hacia el día posnatal 15. En este mismo sentido, la maduración de los aspectos electrofisiológicos y moleculares también ocurre con anterioridad a la maduración de las NEMs y durante este período están sujetas a un control cortical más fuerte que las NEMs (Tepper y col. 1998; Schlosser y col. 1999; Chesselet y col. 2007).

En resumen, la literatura actual sugiere que el aspecto morfológico y funcional del microcircuito estriatal se asemeja al aspecto adulto hacia la cuarta semana de vida, que en roedores corresponde a la infancia tardía o preadolescencia (**Cuadro I.5**). El hecho de que algunos componentes del circuito maduren antes que otros, sugiere la idea de que los primeros influyen sobre la maduración de los segundos, como podría ser el caso de las vías dopaminérgicas o las interneuronas GABAérgicas sobre las NEMs. Poco se conoce sobre el establecimiento y maduración postnatal de los canales córticoestriatales, y acerca de los cambios funcionales y anatómicos del circuito estriatal durante la adolescencia. Estudios recientes de tractografía cerebral en humanos demostraron que la conectividad de los canales paralelos córticoestriatales se establece con distintos grados de fuerza, y que el balance de conectividad entre los canales de un individuo puede predecir algunos rasgos de la personalidad, como ser la búsqueda de novedad o la búsqueda de recompensa. La fuerza de la conectividad podría deberse a distintos factores, como la mielinización, densidad y geometría de los axones (Cohen y col. 2009), sugiriendo que procesos madurativos podrían influir en la conformación anatómica de los circuitos e impactar sobre aspectos de la personalidad. En este sentido, también se cree que algunas patologías del desarrollo relacionadas con los GB, como las pertenecientes al espectro de trastornos obsesivos compulsivos, estarían asociadas a alteraciones de procesos madurativos que podrían modificar la comunicación entre los canales paralelos y la plasticidad córticoestriatal (Yin y Knowlton 2006).

### Eventos de maduración estriatal en roedores



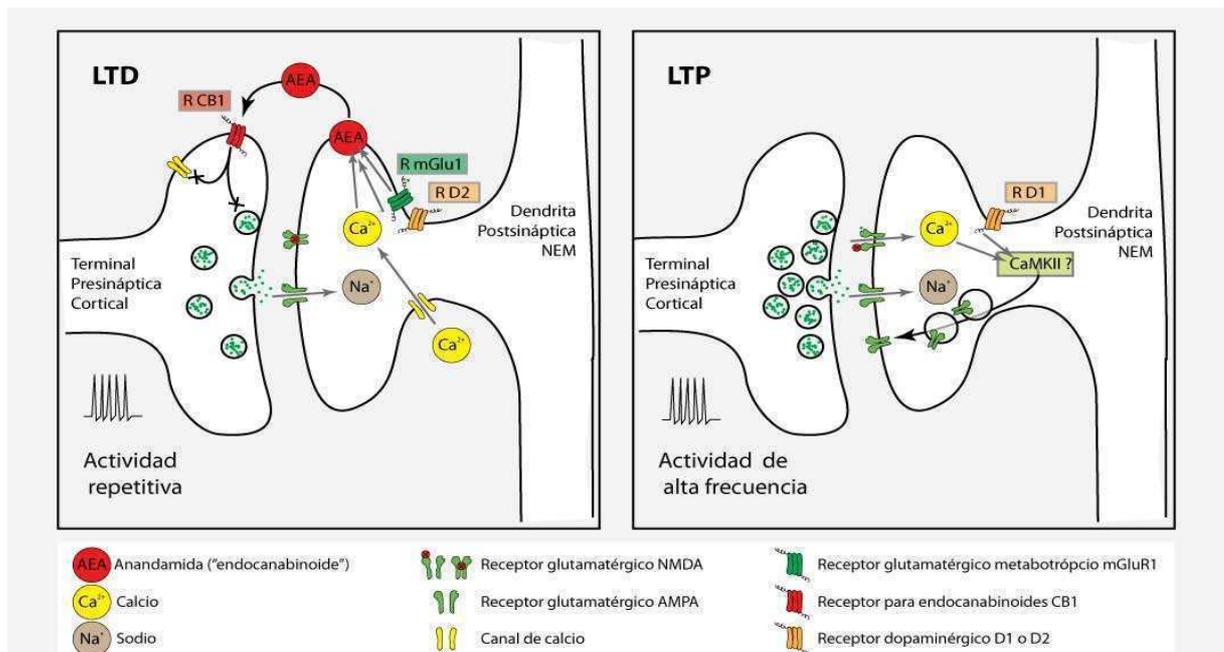
**Cuadro I.5 Esquema de las edades correspondientes a distintas etapas del desarrollo en roedores y cambios clave en la maduración de los circuitos estriales.**

Muchos aspectos del circuito estriatal son inmaduros durante las primeras semanas de vida y alcanzan valores comparables a los adultos hacia quinta o sexta semana de vida que correspondería al final de la infancia y a la adolescencia de roedores.

Butler y col 1998  
Tepper y col 1998  
McCutcheon & Marinelli 2009

### Sección III. Plasticidad sináptica córticoestriatal y conductas de los GB

*Las funciones normales del cerebro adulto dependen de las capacidades computacionales de los circuitos neuronales. La modificación de la eficacia sináptica en distintas regiones del cerebro ha sido vinculada con la adquisición de estas capacidades como resultado de la experiencia y el aprendizaje. Las sinapsis córticoestriatales no son la excepción y se cree que la plasticidad de estos circuitos dependería en parte de la dopamina. La plasticidad sináptica córticoestriatal, además de cumplir un rol en el aprendizaje, podría modular la formación de los circuitos córticoestriatales durante el desarrollo postnatal.*



**Cuadro I.6 Diagramas esquemáticos de los mecanismos propuestos para la LTD y LTP córticoestriatal**

La inducción de la LTD ocurriría en la postsinapsis. Los mecanismos de inducción incluyen la activación de canales de calcio voltaje dependientes y la activación de receptores glutamatérgicos metabotrópicos. Estas dos vías estimulan la síntesis y liberación de endocanabinoide (anandamida) que actúa sobre receptores presinápticos CB1. La activación combinada de receptores CB1 con actividad electrofisiológica presináptica produce una disminución de la probabilidad de liberación de glutamato, probablemente a través de una disminución de la actividad de canales de calcio o de la fusión vesicular. Los receptores dopaminérgicos tipo D2 cumplirían un rol facilitatorio para la síntesis de endocanabinoides.

La inducción de LTP requiere la activación de receptores glutamatérgicos tipo NMDA junto con la activación de receptores dopaminérgicos D1. El ingreso de calcio a través del receptor NMDA produciría cambios bioquímicos probablemente a través de la activación de la quinasa dependiente de calmodulina (CaMKII). Como resultado de la inducción de LTP se produce un aumento de receptores glutamatérgicos tipo AMPA, indicando que el sitio de expresión al igual que el de inducción de la LTP es postsináptico.

Adaptado de Lovinger 2010.

A pesar de que parecen tener mucho en común, los mecanismos de plasticidad sináptica relacionados con la maduración de circuitos neuronales y aquellos relacionados con el aprendizaje y la memoria suelen ser estudiados separadamente. La sinaptogénesis, el podado sináptico y la mielinización modifican las capacidades computacionales de los circuitos a través de un aumento de la eficiencia y velocidad del procesamiento de la información durante el desarrollo, pero también pueden contribuir en el cerebro adulto a la formación de asociaciones nuevas (Watson y col. 2006; Luna 2009). El destino final de los contactos sinápticos dependerá del resultado de una competencia entre procesos de estabilización y podado. Esta competencia es dependiente del uso, ya que durante el desarrollo las sinapsis que no son usadas se pierden, mientras que las que establecen contactos efectivos entre la pre y postsinapsis se estabilizan (Konradi y Heckers 2001); de manera similar, las sinapsis nuevas que participan en procesos de aprendizaje en el cerebro adulto persisten.

El ensamblado y desensamblado de sinapsis y la formación de espinas dendríticas ocurren rápidamente en el cerebro como respuesta a un aumento de la actividad neuronal. De hecho, la estimulación de alta frecuencia en rodajas de hipocampo induce, al cabo de una hora, la formación de nuevas espinas. Este cambio morfológico está asociado a una potenciación a largo plazo de las mismas sinapsis, sugiriendo un vínculo funcional entre ambos procesos (Engert y Bonhoeffer 1999; Toni y col. 1999). La potenciación (LTP) y depresión (LTD) a largo plazo fueron propuestas como la base celular del aprendizaje y de la memoria. Experimentos recientes mostraron que saturando la capacidad del hipocampo de inducir LTP es posible impedir la formación de nuevas memorias espaciales, mientras que la adquisición de memorias dependientes de hipocampo ocluye la capacidad de inducir LTP experimentalmente (Gruart y col. 2006; Whitlock y col. 2006). Por otro lado, la LTP y LTD podrían mediar la maduración sináptica dependiente de actividad durante el desarrollo.

En el caso de las sinapsis córticoestriatales, existe una extensa literatura relativa a los mecanismos de LTP y LTD, y de plasticidad estructural, orientada principalmente a comprender su rol en el aprendizaje y en condiciones patológicas como la enfermedad de Parkinson y el abuso de drogas (Kreitzer y Malenka 2008; Calabresi y col. 2009; Surmeier y col. 2009). Mucho menos se conoce

sobre cómo la LTD y LTP córticoestriatal contribuyen al establecimiento de circuitos paralelos córticoestriatales durante el desarrollo.

En esta sección discutimos las características principales de la plasticidad córticoestriatal y su rol en aprendizajes normales del sistema adulto y su posible relación con patologías de los GB.

### *Características generales de la LTD y LTP córticoestriatal. Rol de la dopamina y los endocannabinoides*

En la década de 1970 fue demostrado que la estimulación repetitiva de aferencias excitatorias en el hipocampo produce cambios perdurables en la potencia sináptica (Bliss y Gardner-Medwin 1973). A partir de entonces, distintas formas de plasticidad sináptica incluyendo la depresión o potenciación de largo término han sido descritas en distintas estructuras del cerebro. Un protocolo para inducir plasticidad sináptica que fue ampliamente estudiado *in vitro* es la estimulación eléctrica de alta frecuencia de aferencias excitatorias, usualmente con trenes de 100 Hz.

En el sistema córticoestriatal, protocolos de estimulación de alta frecuencia fueron aplicados exitosamente para inducir plasticidad sináptica. La plasticidad sináptica córticoestriatal presenta algunas particularidades que la diferencian de la que tiene lugar en otras sinapsis. Probablemente la más distintiva es que *in vitro* la estimulación de alta frecuencia de las aferencias excitatorias junto con una despolarización de la NEM normalmente induce LTD mientras que en el hipocampo protocolos similares inducen LTP (Calabresi y col. 1992; Lovinger y col. 1993; Walsh 1993). Otra diferencia es que la expresión de LTD en el hipocampo depende de la estimulación de receptores glutamatérgicos tipo NMDA, mientras que la LTD córticoestriatal es independiente de estos receptores (Calabresi y col. 1992; Dudek y Bear 1992).

Entre los mecanismos necesarios para la expresión de LTD córticoestriatal inducida por estimulación de alta frecuencia, la participación de la dopamina fue ampliamente reconocida desde la descripción inicial de esta plasticidad. Esta percepción se basó en que *in vitro* la administración de antagonistas de receptores dopaminérgicos tipo D1 y D2, la lesión unilateral de las proyecciones dopaminérgicas

nigroestriatales con la toxina 6-hidroxidopamina y la eliminación genética del receptor dopaminérgico D2 bloquean la expresión de la LTD córticoestriatal (Calabresi y col. 1992; Calabresi y col. 1997). Otros mecanismos relacionados con este tipo de plasticidad incluyen la estimulación de receptores metabotrópicos postsinápticos para glutamato tipo I (mGluR 1, Gubellini y col. 2001; mGluR 1, Sung y col. 2001), la activación de canales de calcio dependientes de voltaje y la entrada postsináptica de calcio (Calabresi y col. 1992; Bonsi y col. 2003).

En conjunto, esta evidencia ha sugerido que la inducción de LTD requiere de procesos postsinápticos mientras que es aceptado que la fase de expresión de la LTD dependería de un mecanismo presináptico por el cual disminuye la probabilidad de liberación de glutamato de las terminales córticoestriatales (Choi y Lovinger 1997; Lovinger 2010). Actualmente se acepta que la vinculación entre estos dos procesos estaría dada por un mecanismo de señalización retrógrada mediado por endocannabinoides. Los endocannabinoides liberados postsinápticamente activan receptores CB1 presinápticos de las terminales córticoestriatales y gatillan un mecanismo de supresión de liberación de neurotransmisor. Este tipo de mecanismos ha sido descrito tanto en terminales inhibitorias como excitatorias con efectos de largo o corto plazo en distintas regiones del cerebro (Heifets y Castillo 2009).

Si bien la dependencia dopaminérgica en la inducción de la LTD córticoestriatal fue considerada crucial durante mucho tiempo, actualmente el rol de la dopamina es más debatido (Wickens 2009; Lovinger 2010). Por ejemplo, en presencia de antagonistas del receptor dopaminérgico D2 es posible inducir LTD en rodajas de cerebro mediante la aplicación de agonistas de los receptores mGluR 1 (Kreitzer y Malenka 2005) o mediante la activación de canales de calcio tipo L en combinación con actividad postsináptica moderada (Adermark y Lovinger 2007). Estos resultados indican que experimentalmente el requerimiento de la estimulación de receptores D2 puede ser eludido y plantean que más que permitir la inducción de la LTD, el rol de estos receptores sería modularla, aumentando la probabilidad de que ocurra (Lovinger 2010). Es interesante notar que la vía final común a todos estos mecanismos (vale decir, estimulación de receptores D2, mGluR 1 y entrada de calcio postsináptica) sería la síntesis de endocannabinoides (Heifets y Castillo 2009) y que la estimulación farmacológica de

los receptores CB1 es capaz de inducir LTD córticoestriatal similar a la inducida por estimulación de alta frecuencia (Adermark y Lovinger 2007; Singla y col. 2007). Sin embargo, la activación de los receptores CB1 por sí misma es insuficiente para inducir depresión sináptica ya que también es necesaria la actividad simultánea de las vías aferentes. Esta propiedad le confiere a las NEMs una especificidad muy fuerte, ya que frente a una liberación postsináptica de endocannabinoides (con alta capacidad de difusión) la LTD se expresaría únicamente en las sinapsis cuyas terminales presinápticas están simultáneamente activas (Singla y col. 2007) .

A diferencia de las formas de potenciación a largo plazo estudiadas en el hipocampo, la inducción de LTP estriatal ha sido más difícil de obtener experimentalmente y por lo tanto el conocimiento de los mecanismos para su inducción y expresión son menos comprendidos que los de la LTD córticoestriatal (Kreitzer y Malenka 2008). Para lograr la LTP córticoestriatal por estimulación de alta frecuencia, fue necesario recurrir a la remoción del magnesio de la solución de registro extracelular. Dado que en condiciones de reposo el receptor para glutamato tipo NMDA está sujeto a inactivación por magnesio, la remoción de este ion del medio extracelular podría permitir su actividad durante la estimulación de alta frecuencia. La dependencia de los receptores NMDA en este tipo de plasticidad fue confirmada mediante estudios farmacológicos (Calabresi y col. 1992). Otros mecanismos que estarían involucrados en este tipo de plasticidad son la estimulación del receptor dopaminérgico D1 y la entrada de calcio postsináptico (Calabresi y col. 1992; Kerr y Wickens 2001). La necesidad de trabajar en ausencia de magnesio dio lugar a la interpretación de que la LTP córticoestriatal podía estar relacionada con procesos patológicos (Calabresi y col. 1997). Sin embargo, también fue posible obtener LTP en condiciones normales de magnesio extracelular mediante la aplicación simultánea de pulsos de dopamina y estimulación presináptica de alta frecuencia, sugiriendo un mecanismo sinérgico entre el receptor NMDA y la dopamina (Wickens y col. 1996). Si bien no existe evidencia experimental directa, también ha sido propuesto que la expresión de la LTP córticoestriatal (al igual que la LTP dependiente de receptores NMDA en otras estructuras cerebrales) involucraría un aumento de la expresión en membrana postsináptica de receptores para glutamato tipo AMPA (Lovinger 2010,

#### **Cuadro I.6)**

Es importante mencionar que los resultados descriptos hasta el momento fueron obtenidos *in vitro* pero que también fue posible obtener *in vivo* distintas formas de plasticidad sináptica experimental mediante estimulación de alta frecuencia (Charpier y Deniau 1997; Reynolds y Wickens 2000). Sin embargo, los mecanismos de plasticidad *in vivo* son menos conocidos y su significado funcional tampoco es tan claro. Dado que la descarga de potenciales de acción corticales y estriatales es relativamente escasa *in vivo*, los protocolos de plasticidad basados en estimulación de alta frecuencia han sido considerados “poco fisiológicos” y podrían no tener un correlato funcional durante la ejecución de conductas en los animales despiertos (Pawlak y Kerr 2008). En este sentido los protocolos de plasticidad inducida por el apareamiento temporal de la descarga postsináptica y la actividad presináptica (spike timing dependent plasticity, STDP) son un mejor candidato como sustrato de los cambios de eficacia sináptica *in vivo*, en particular en el contexto del aprendizaje (Markram y col. 1997), y recientemente ha sido demostrado que en las sinapsis córticoestriatales es posible inducir STDP (Fino y col. 2005; Pawlak y Kerr 2008; Shen y col. 2008).

#### *Conductas mediadas por los GB y plasticidad sináptica*

Es aceptado que los GB están relacionados estrechamente con procesos de aprendizaje y memoria. Una serie de trabajos recientes han permitido relacionar de manera bastante precisa distintas regiones estriatales con formas específicas del aprendizaje (Cuadro I.3). Por ejemplo, la región dorsomedial del estriado ha sido vinculada con la fase inicial del aprendizaje de habilidades motoras y de tareas instrumentales dirigidas a obtener metas, la región dorsolateral del estriado con la fase de perfeccionamiento de habilidades motoras y la formación hábitos instrumentales, mientras que la región ventral del estriado ha sido relacionada con la adquisición del condicionamiento pavloviano (Yin y Knowlton 2006; Yin y col. 2008; Balleine y col. 2009). Los mecanismos de plasticidad sináptica córticoestriatal serían la base celular de estos aprendizajes. Por ejemplo la administración intracerebral en la región dorsomedial del estriado de antagonistas del receptor NMDA -relacionados

con la LTP- impide la formación de un aprendizaje instrumental dirigido a obtener recompensas (Yin y col. 2005). Mediante experimentos similares, otros componentes de la LTP o LTD como los receptores D1 y CB1 también han sido implicados en aprendizajes dependientes del estriado (Hilario y col. 2007; Yin y col. 2009).

El registro de la actividad de neuronas estriatales durante el entrenamiento de un aprendizaje de coordinación motora permitió comprobar que en las primeras sesiones de entrenamiento las neuronas que se activan en relación a la tarea motora se encuentran en la región dorsomedial del estriado. A medida que las sesiones de entrenamiento avanzan, la conducta tiende a un límite de perfeccionamiento y el aprendizaje parece enlentecerse, ya que la tasa de mejoría de la conducta decrece. Simultáneamente con este proceso el número de neuronas asociadas a la conducta entrenada de la región dorsomedial del estriado disminuye y aumenta el número de neuronas reclutadas de la región dorsolateral del estriado (Costa y col. 2004). Este resultado sugiere que el control sobre la conducta cambia de dominio durante las distintas instancias del aprendizaje, pasando de un canal córticoestriatal hacia otro. El reclutamiento de cada canal con cada fase del entrenamiento también está asociado a un aumento en la eficacia sináptica córticoestriatal. La transmisión mediada por receptores AMPA aumenta en la región dorsomedial durante la fase inicial y en la región dorsolateral durante fase final del entrenamiento, sugiriendo la presencia de un mecanismo celular de LTP (Yin y col. 2009). Entonces, durante la progresión de un aprendizaje normal mediado por los GB la plasticidad sináptica y la interacción entre los canales córticoestriatales parece ocupar un lugar crucial. Por otro lado, fallas en la plasticidad córticoestriatal también pueden contribuir a patologías de los GB. En el modelo experimental de la enfermedad de Parkinson obtenido por lesión de neuronas dopaminérgicas la función estriatal muestra una serie de alteraciones. Entre ellas, hay un aumento de la actividad de las NEMs, una disminución de la capacidad de inducir LTD experimentalmente y una pérdida de espinas dendríticas (Tseng y col. 2001; Day y col. 2006; Kreitzer y Malenka 2007) . Notablemente, la lesión dopaminérgica también produce una alteración en la segregación de los canales paralelos córticoestriatales (Tseng y col. 2001). Por lo tanto, la dopamina y la plasticidad

córticoestriatal parecen ser importantes para el adecuado funcionamiento de los GB a través del mantenimiento e interacción entre los canales córticoestriatales.

Los resultados revisados apoyan la idea de que la LTP y la LTD podrían ser los mecanismos celulares fisiológicos de los aprendizajes mediados por los GB y de que condiciones patológicas del adulto relacionadas con los GB podrían estar asociadas a alteraciones de la plasticidad sináptica córticoestriatal (Calabresi y col. 2007; Kreitzer y Malenka 2008). Sin embargo, existe escasa o nula información sobre cómo la plasticidad córticoestriatal que ocurre durante el desarrollo postnatal condiciona la conducta normal o patológica del adulto.

#### **Sección IV. Maduración postnatal del sistema córticoestriatal y rol de la dopamina.**

*La plasticidad sináptica modulada por dopamina podría ser la base celular de la maduración postnatal "dependiente de actividad" de los circuitos córticoestriatales. Durante las primeras semanas de vida las vías dopaminérgicas expresan una serie de cambios morfológicos y funcionales que podrían estar asociados con procesos madurativos de plasticidad córticoestriatal. La destrucción temprana de las neuronas dopaminérgicas produce alteraciones neuroquímicas y conductuales que perduran en el animal adulto sugiriendo posibles alteraciones funcionales de los circuitos córticoestriatales.*

En la sección anterior describimos cómo la dopamina podría tener un papel importante en la plasticidad de los circuitos córticoestriatales durante aprendizajes de conductas mediadas por los GB en animales adultos y cómo alteraciones de la plasticidad córticoestriatal en el adulto podrían dar origen a patologías. Sin embargo, los procesos de plasticidad sináptica que contribuyen a la maduración normal de los circuitos córticoestriatales no han sido suficientemente estudiados. En esta sección presentamos evidencia que indica que la función dopaminérgica y la plasticidad córticoestriatal también maduran durante las primeras semanas de vida y mostramos la influencia de estas vías sobre el desarrollo postnatal de los circuitos córticoestriatales analizando el efecto de la denervación temprana de neuronas dopaminérgicas en un modelo de lesión neonatal. Una hipótesis general que guía esta tesis es que una alteración temprana de la función dopaminérgica afecta los procesos de plasticidad córticoestriatal del desarrollo y perturba el establecimiento del conexionado de los circuitos paralelos córticoestriatales, resultando en cambios perdurables en las conductas mediadas por los GB.

##### *Plasticidad durante el desarrollo: Cambios asociados a la función DA*

Una serie de cambios que ocurren en el sistema dopaminérgico durante la infancia permiten pensar que la dopamina cumple un rol importante en el establecimiento y maduración de los circuitos

córticoestriatales a través de mecanismos de plasticidad sináptica. Por ejemplo, durante las primeras semanas de vida la inervación estriatal por fibras dopaminérgicas se establece simultáneamente con el conexasiónado córticoestriatal (Hattori y McGeer 1973). La expresión de receptores dopaminérgicos en el estriado también aumenta postnatalmente hasta alcanzar un pico entre la cuarta y quinta semana de vida (preadolescencia en roedores) para luego declinar hacia valores adultos que se alcanzan varias semanas más tarde (Andersen y col. 2000; Tarazi y Baldessarini 2000). Además de los cambios morfológicos y neuroquímicos, también han sido reportados cambios funcionales. Por ejemplo, la tasa de descarga de las neuronas dopaminérgicas entre la infancia y la adultez presenta un patrón de U invertida, con un pico de actividad durante la adolescencia y niveles de actividad similares entre la infancia y la adultez (McCutcheon y Marinelli 2009). Es importante destacar que a pesar de que algunos aspectos del sistema dopaminérgico parecen ser comparables entre la infancia y la adolescencia, esto no es así para todos los parámetros del sistema. Por ejemplo, la respuesta de las neuronas dopaminérgicas a la nicotina pasa de ser excitatoria en la infancia a inhibitoria en la adultez (McCutcheon y Marinelli 2009). En general, estos hallazgos sugieren que la adolescencia es una etapa de grandes cambios madurativos en los circuitos dopaminérgicos y córticoestriatales.

Estudios de plasticidad sináptica córticoestriatal durante las primeras semanas del desarrollo postnatal en roedores aportan evidencia más directa que apoya la idea de que la plasticidad córticoestriatal y la dopamina están relacionados con el establecimiento de los circuitos córticoestriatales. La maduración de las sinapsis córticoestriatales ocurre de acuerdo a un proceso de expansión y posterior retracción sináptica de modo tal que el número de contactos córticoestriatales aumenta durante las primeras semanas de vida y luego disminuye hasta alcanzar valores adultos (Butler y col. 1998). En paralelo a estos cambios anatómicos una serie de cambios funcionales tienen lugar. Durante el período de expansión de contactos sinápticos, las sinapsis córticoestriatales son más proclives a sufrir LTP inducida por estimulación de alta frecuencia y a medida que el número de conexiones córticoestriatales disminuye, la forma predominante de plasticidad pasa a ser la LTD (Partridge y col. 2000; Tang y Lovinger 2000). Estos resultados sugieren que durante las primeras semanas de vida, la formación de nuevos contactos sinápticos podría estar facilitada por un mecanismo de LTP y que la

LTD se expresaría más tarde sobre las sinapsis que previamente habían acumulado sucesivos eventos de potenciación sináptica (Partridge y col. 2000). En relación a estos cambios plásticos también se observó que la probabilidad de liberación córticoestriatal de glutamato disminuye durante la infancia. Este mecanismo presináptico fue interpretado como un fenómeno fisiológico de LTD de las sinapsis córticoestriatales durante el desarrollo (Choi y Lovinger 1997; Tang y col. 2001). De la misma manera que la plasticidad córticoestriatal inducida experimentalmente, cuya expresión se debe a una disminución presináptica de liberación glutamatérgica, en rodajas, el proceso fisiológico de depresión córticoestriatal durante el desarrollo sería dependiente de endocannabinoides (Ade y Lovinger 2007) y de dopamina -ya que no fue observado en ratones carentes de receptor dopaminérgico D2 ni en ratas con lesión dopaminérgica con 6-OHDA (Tang y col. 2001). Estos resultados indican que la dopamina podría moldear el conexionado córticoestriatal a través de la regulación de la eficacia sináptica córticoestriatal. El significado funcional de la depresión madurativa córticoestriatal no se conoce, aunque se postula que podría cumplir un rol en el refinamiento de los patrones motores durante la experiencia postnatal temprana (Partridge y col. 2000; Ade y Lovinger 2007) .

#### *Patologías asociadas al neurodesarrollo de los GB*

Algunas condiciones neuropsiquiátricas asociadas a alteraciones de la función dopaminérgica y el funcionamiento de los circuitos córticoestriatales, como el síndrome de Gilles de la Tourette y el déficit de atención con hiperactividad, comienzan a expresarse en la infancia y pueden persistir con distintos grados de severidad en la adolescencia tardía y también durante la adultez.

El síndrome de Tourette está caracterizado por tics motores y fonológicos que en la mayoría de los casos se presentan por primera vez alrededor de los cinco años de edad (Jankovic 2001). A diferencia de otras conductas hiperquinéticas, como los movimientos coreicos, los tics de los pacientes con Tourette suelen estar precedidos por sensaciones premonitorias y pueden ser suprimidos voluntariamente por los pacientes a expensas de disconfort y ansiedad, sensaciones que desaparecen luego de la ejecución del tic (Jankovic 2001). Si bien la etiología de esta condición no se conoce, la

evidencia farmacológica y de estudios de imágenes sugiere un rol para la dopamina. En este respecto existe controversia, ya que tanto un estado hiper- como hipo-dopaminérgico han sido propuestos como base neurobiológica de la condición (Mink 2001; Nomura y Segawa 2003).

El déficit de atención con hiperactividad (ADHD su sigla en inglés) se presenta con distintos grados de alteración en la atención, impulsividad e hiperactividad motora. Algunos de estos signos -especialmente la hiperactividad- suelen revertir espontáneamente en los adultos, pero otros persisten. De acuerdo a la prevalencia de los signos conductuales, el ADHD puede ser clasificado en el subtipo inatento, impulsivo/hiperactivo o combinado (DSM IV).

La etiología del ADHD tampoco ha sido adecuadamente aclarada y se cree que podría ser el resultado de una combinación de múltiples factores genéticos predisponentes y mecanismos que actúan durante etapas tempranas del desarrollo (Toft 1999; Sagvolden y col. 2005a). El diagnóstico del ADHD en niños se realiza mediante cuestionarios a los padres y educadores, pero en la actualidad no existe un criterio de diagnóstico inequívoco y cuantificable. Por este motivo, la detección de endofenotipos (características fenotípicas cuantificables de manera objetiva) permitiría un avance en el diagnóstico y tratamiento del ADHD (Castellanos y Tannock 2002). Evidencias provenientes de distintas disciplinas involucran a la dopamina, los circuitos de los GB y la corteza frontal con el desarrollo de esta condición.

Estudios genéticos de casos familiares, de hermanos gemelos y de adopción detectaron variantes alélicas de genes candidato que serían predisponentes del ADHD como el receptor dopaminérgico D4 -que se expresa preferencialmente en la corteza prefrontal- y el transportador de dopamina DAT (Cook y col. 1995; Faraone y Biederman 1998; Rowe y col. 1998; Durston y col. 2005). Evidencias farmacológicas también vinculan al ADHD con una disminución de la función dopaminérgica ya que el tratamiento clásico con psicoestimulantes como anfetamina y metilfenidato -que reducen la hiperactividad y mejoran el déficit atencional- produce un aumento extracelular de aminas biógenas, especialmente de dopamina (Swanson y Volkow 2002; Volkow y col. 2005). Mediante estudios de imágenes estructurales de gemelos discordantes para ADHD se encontró que existe una disminución

del volumen estriatal, indicando un posible sustrato estructural en relación con el ADHD. Sin embargo, esta diferencia desaparece hacia el final de la adolescencia a pesar de la persistencia de algunos signos clínicos, sugiriendo la existencia de un retraso madurativo más que de daños morfológicos permanentes (Castellanos y col. 2002). Estudios de imágenes funcionales utilizando un paradigma de “go/no-go”, mostraron que los pacientes con ADHD presentan disminuida la capacidad de inhibir una respuesta motora bajo la condición “no-go” junto con una menor activación de los GB (Durstun y col. 2003). Por último, mediante tomografía de emisión de positrones se encontró que en pacientes adultos con ADHD la actividad dopaminérgica se encuentra disminuida en relación con procesos atencionales y en respuesta a estímulos con propiedades de recompensa (Swanson y col. 2007; Volkow y col. 2009). Estas evidencias sustentan una hipótesis muy difundida según la cual un estado hipodopaminérgico funcional instalado desde etapas tempranas del desarrollo, que podría ser resultante de factores genéticos predisponentes, factores etiológicos ambientales -como la exposición prenatal a drogas- y psicosociales adversos, podría conducir al ADHD (Castellanos y Tannock 2002; Biederman y Faraone 2005; Sagvolden y col. 2005a; Swanson y col. 2007; Volkow y col. 2009).

Es interesante que el ADHD suele ser comórbido con el síndrome de Tourette, y que ambas condiciones predisponen para el surgimiento del trastorno obsesivo compulsivo, que también ha sido asociado con alteraciones funcionales de circuitos córticoestriatales (Graybiel y Rauch 2000; Graybiel 2008) sugiriendo mecanismos comunes a través de los circuitos neuronales involucrados (Jankovic 2001; Torregrossa y col. 2008). En tal sentido, el sustrato común a los aspectos impulsivos y compulsivos de estas patologías podría ser los circuitos que controlan las conductas dirigidas a obtener metas y la formación de hábitos, que están relacionados con el circuito córticoestriatal cognitivo (Torregrossa y col. 2008).

#### *Lesión dopaminérgica neonatal. Características conductuales y farmacológicas.*

El estudio de los mecanismos por los cuales la dopamina influye sobre el desarrollo córticoestriatal condicionando la conducta y la patología se ve limitado por la disponibilidad de modelos animales.

Uno de los modelos más antiguos y que ha resistido el paso del tiempo es la lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas con la toxina 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA). Es bien sabido que la lesión bilateral de las vías nigroestriatales en roedores adultos produce un severo cuadro de aquinesia, adipsia y afagia y por lo tanto ha sido utilizada como modelo de la enfermedad de Parkinson (Ungerstedt 1971). Por el contrario, la lesión bilateral de neuronas dopaminérgicas en ratas o ratones neonatos, no produce en ninguna etapa del desarrollo estas alteraciones neurológicas. De hecho, los roedores con lesión dopaminérgica neonatal lactan de manera normal y luego del destete se alimentan y toman agua por sí mismos de la misma manera que los ratones control (Shaywitz y col. 1976a; Avale y col. 2004a). Más allá de un leve retraso en la tasa de crecimiento y un menor tamaño corporal, los ratones lesionados y los control son indistinguibles a simple vista (Avale y col. 2004a).

La 6-OHDA produce la muerte de una gran cantidad de neuronas dopaminérgicas que proyectan al estriado y en menor medida a la corteza prefrontal. La mayor pérdida de neuronas (más del 80%) se da en la región de la sustancia negra cuyas proyecciones llegan al estriado dorsal (Avale y col. 2004a). Esta pérdida de neuronas persiste a lo largo del desarrollo postnatal, pero una serie de mecanismos compensatorios que tienden a aumentar la transmisión dopaminérgica han sido reportados (Davids y col. 2003). Algunos de estos mecanismos son un aumento del mensajero de la enzima tirosina hidroxilasa (indispensable en la biosíntesis de la dopamina), pérdida de autorreceptores D2 (cuya activación inhibe el disparo de potenciales de acción y liberación dopaminérgica presináptica), disminución de la actividad del transportador de dopamina (DAT, que elimina la dopamina del espacio sináptico) y cambios en la sensibilidad de los receptores dopaminérgicos D1 y D2 (Davids y col. 2003). Otro mecanismo compensatorio ampliamente reconocido es el aumento de la inervación y del contenido serotoninérgico estriatal en la región dorsal del estriado (Towle y col. 1989; Avale y col. 2004b; Breese y col. 2005). Muchos de estos mecanismos compensatorios son evidentes desde la infancia y tienen un efecto que perdura hasta la adultez.

Desde el punto de vista conductual, la lesión produce una serie de alteraciones. La característica que ha sido más estudiada es la aparición de un período de hiperactividad locomotora que se observa desde días antes del destete y que revierte espontáneamente antes de la adultez, hacia la quinta o sexta

semana de vida (Shaywitz y col. 1976a; Avale y col. 2004a). Algunos autores reportaron que la magnitud y duración de este período de hiperlocomoción depende de la dosis de 6-OHDA y ha sido sugerido que el grado de hiperactividad locomotora correlaciona con el grado de pérdida dopaminérgica (Miller y col. 1981). Sin embargo, también ha sido propuesto que este fenotipo conductual depende de la hiperinervación compensatoria serotoninérgica, ya que la lesión dopaminérgica neonatal sumada a la destrucción selectiva de las vías serotoninérgicas produce una exacerbación del fenotipo hiperlocomotor (Brus y col. 2004).

Además de la reversión espontánea entre la infancia y la adultez, una característica ampliamente documentada de la hiperlocomoción inducida por la lesión dopaminérgica neonatal es la respuesta atípica a los psicoestimulantes como la amfetamina y el metilfenidato. Estos psicoestimulantes actúan a través del bloqueo de la recaptación de aminas como la dopamina, noradrenalina y serotonina, aumentando su concentración en el espacio extracelular (Rothman y Baumann 2003). En animales normales, se cree que el aumento de la liberación dopaminérgica en los circuitos frontoestriatales es responsable de causar la hiperactividad característicamente asociada a este tipo de drogas (Wilkinson y col. 1993). En ratas y ratones con lesión dopaminérgica neonatal la respuesta atípica a estos psicoestimulantes se manifiesta con una reversión del fenotipo hiperlocomotor (Shaywitz y col. 1976b; Shaywitz y col. 1978; Avale y col. 2004a). Este efecto es dosis dependiente y a pesar de que se cree que estaría mediado por un aumento de la disponibilidad extracelular de serotonina o noradrenalina (Gainetdinov y col. 1999; Russell y col. 2005) no existe consenso acerca de este mecanismo (Avale y col. 2004b).

Si bien la hiperlocomoción es probablemente el fenotipo conductual más estudiado, otras alteraciones como déficit de habituación, de aprendizajes motores y de memoria han sido reportadas. Estas alteraciones conductuales tienden a desaparecer durante la vida adulta sugiriendo un retraso en la maduración de estas capacidades. Al igual que la hiperlocomoción la administración de psicoestimulantes mejora estos déficit (revisado en Davids y col 2003). Sin embargo, utilizando paradigmas de aprendizaje basado en la obtención de recompensas también ha sido demostrado que la

lesión dopaminérgica neonatal puede deteriorar la adquisición de conductas instrumentales en animales adultos (Moy 1995; Nemirovsky y col. 2009).

Por sus características conductuales, la lesión dopaminérgica neonatal en roedores ha sido utilizada como modelo para estudiar algunas conductas presentes en distintas condiciones psiquiátricas (para revisión ver Breese 2005). Probablemente, la más estudiada sea el ADHD. Si bien existen otros modelos animales (Davids y col. 2003; Sagvolden y col. 2005b) y la lesión dopaminérgica neonatal no reproduce la etiología del ADHD (“validez de construcción”), esta lesión ha sido el modelo de elección de muchos autores porque reproduce aspectos centrales del fenotipo conductual (“validez fenotípica”), porque tiene valor predictivo en la evaluación de terapias farmacológicas (“validez de predicción”) y porque podría ser útil para la detección de endofenotipos (Castellanos y Tannock 2002; Davids y col. 2003; Avale y col. 2004a; van der Kooij y Glennon 2007) .

La integridad de las vías dopaminérgicas nigroestriatales, entonces, es importante para la maduración de los circuitos frontoestriatales durante la infancia y adolescencia. Sin embargo, los mecanismos que subyacen al establecimiento anatómico y funcional de los circuitos córticoestriatales no han sido esclarecidos. Comprender los mecanismos neurobiológicos de la maduración postnatal córticoestriatal puede contribuir a comprender cómo se establecen las conductas patológicas en diversos desórdenes neuropsiquiátricos, entre ellos, el ADHD.

## OBJETIVOS E HIPÓTESIS.

Esta tesis de doctorado se enmarca en un proyecto cuyo **objetivo general** es esclarecer los mecanismos postnatales que promueven la maduración funcional del sistema córticoestriatal y su relación con el establecimiento, adquisición y expresión de conductas controladas por los ganglios de la base (GB) en condiciones normales y patológicas. La **hipótesis general** detrás de este objetivo es que los circuitos córticoestriatales son inmaduros al momento del nacimiento y que durante la infancia y adolescencia ocurren cambios sustanciales en el conexionado anatómico y funcional que le confieren a estos circuitos las características del sistema adulto. En estos procesos madurativos la dopamina jugaría un papel central y la conectividad adquirida durante el desarrollo y moldeada por la experiencia condicionaría las conductas mediadas por los GB. Un corolario de esta hipótesis es que alteraciones postnatales que afecten la conectividad córticoestriatal podrían ser el sustrato de alteraciones conductuales asociadas a patologías de los GB que podrían manifestarse en distintas etapas de la vida.

En esta tesis estudiamos los cambios que ocurren en el sistema córticoestriatal a lo largo del desarrollo postnatal en presencia y ausencia de las vías dopaminérgicas. El primer objetivo específico fue **establecer un modelo experimental de lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas y caracterizar las alteraciones conductuales y neuroquímicas que ocurren como consecuencia de dicha lesión**. Una alteración conductual ampliamente estudiada en este modelo es la hiperactividad locomotora que aparece de manera transitoria antes de la adolescencia y revierte espontáneamente en la adultez; por esta característica conductual, entre otras, la lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas ha sido propuesta como modelo de ADHD. Experiencias en distintos laboratorios sugieren que la aparición de este fenotipo correlaciona con el grado de pérdida dopaminérgica mientras que otros autores han propuesto un rol para la serotonina en la expresión de la conducta hiperlocomotora. Nuestra hipótesis es que *el fenotipo hiperlocomotor inducido por la lesión está asociado a un patrón específico de denervación dopaminérgica e hiperinervación serotoninérgica compensatoria estriatal*.

El siguiente **objetivo fue estudiar si existen alteraciones funcionales en los circuitos córticoestriatales que estén asociadas a las alteraciones conductuales inducidas por la lesión neonatal**. Las proyecciones dopaminérgicas terminan principalmente en el estriado y en menor medida en la corteza frontal, estructuras que se conectan entre sí a través de proyecciones córticoestriatales. Funcionalmente, las neuronas principales estriatales son normalmente silentes y responden solamente a entradas corticales fuertemente sincronizadas. Además, se cree que las vías dopaminérgicas podrían controlar la precisión temporal con que las neuronas estriatales descargan potenciales de acción. Por lo tanto, planteamos la hipótesis de que *el fenotipo hiperlocomotor inducido por la lesión dopaminérgica está asociado a cambios en la conectividad funcional entre la corteza frontal y el estriado dorsal, en donde la denervación dopaminérgica y compensación serotoninérgica es mayor*.

El tercer objetivo fue **determinar si en el pasaje de la infancia a la adultez ocurren cambios madurativos en la función de los circuitos córticoestriatales y si la maduración normal de estos circuitos depende de la integridad de las vías dopaminérgicas**. Existe abundante evidencia que indica que el sistema nervioso central de mamíferos completa su maduración a lo largo de distintas etapas del desarrollo postnatal. En particular, ha sido demostrado que los circuitos corticales recién expresan sus características adultas luego de la adolescencia. Por lo tanto es razonable pensar que los circuitos córticoestriatales completan su maduración luego de este período del desarrollo. En este sentido, la evidencia conductual indica que la hiperactividad locomotora inducida por la lesión dopaminérgica neonatal revierte espontáneamente hacia la adolescencia, sugiriendo para esta etapa del desarrollo un posible rol en cambios funcionales de los circuitos córticoestriatales. Nuestra hipótesis es que *la maduración de los circuitos córticoestriatales se completa luego de la adolescencia y que es facilitada por las vías dopaminérgicas; en los animales con lesión neonatal la maduración de estos circuitos se ve retrasada y sería facilitada, en cambio, por mecanismos compensatorios*.

El cuarto objetivo fue **caracterizar *in vivo* la plasticidad córticoestriatal inducida experimentalmente en distintas etapas del desarrollo postnatal y la influencia de las vías dopaminérgicas**. Es sabido que las sinapsis córticoestriatales son susceptibles de sufrir cambios plásticos como la potenciación y depresión a largo término y se cree que estos mecanismos estarían involucrados en aprendizajes mediados por los GB. También se sabe que tanto los aprendizajes como la plasticidad córticoestriatal inducida experimentalmente dependen en parte de la dopamina y ha sido sugerido que existiría un proceso fisiológico de depresión de las sinapsis córticoestriatales que ocurriría a lo largo del desarrollo postnatal. Nosotros proponemos que *a lo largo de la infancia y adolescencia existe un refinamiento del conexionado córticoestriatal que estaría mediado por un mecanismo fisiológico de depresión a largo término dependiente de las vías dopaminérgicas cuyo rol sería reducir la eficacia de las sinapsis que no participan en conductas adquiridas durante la experiencia postnatal*.

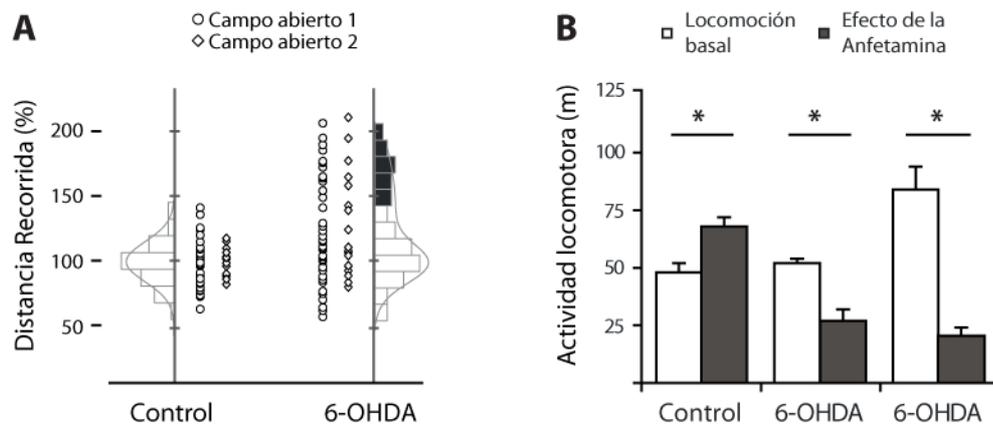
Finalmente, el último objetivo de la tesis fue **establecer si a lo largo del desarrollo postnatal las vías dopaminérgicas facilitan la integración de información cortical a nivel estriatal y si están involucradas en la interacción entre canales paralelos córticoestriatales**. Una característica saliente de la organización anátomo-funcional de los GB es que conforman circuitos parcialmente segregados que permiten el procesamiento de información cortical en paralelo. La adquisición de aprendizajes asociativos necesarios para el establecimiento de las conductas mediadas por los GB probablemente dependa de la capacidad estriatal de integrar distintos tipos de información y de la comunicación entre los canales córticoestriatales y ha sido propuesto que estos procesos dependerían fuertemente de las vías dopaminérgicas mesoestriatales. Nuestra hipótesis es que *la destrucción temprana de las vías dopaminérgicas impide la integración estriatal de la información proveniente de distintas áreas corticales aumentando el grado de segregación de los canales paralelos córticoestriatales a lo largo de todas las etapas del desarrollo postnatal*.

## RESULTADOS

### Sección I

#### *Lesión dopaminérgica neonatal: Caracterización conductual y neuroquímica del modelo experimental.*

La lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas con la toxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) en ratas (Shaywitz y col. 1976a; Miller y col. 1981) y en ratones (Avale y col. 2004a) produce un fenotipo hiperlocomotor que se expresa durante la infancia y revierte espontáneamente en la adultez. En general, ha sido reportado que el grado de disminución dopaminérgica necesario para la expresión de este fenotipo debe ser entre el 80 y 90% ya que se cree que lesiones más severas inducen acinesia mientras que lesiones más moderadas son superadas por mecanismos compensatorios (Miller y col. 1981; Avale y col. 2004a). Implementamos la lesión dopaminérgica neonatal en el laboratorio de acuerdo al protocolo descrito por Avale y colaboradores (2004, métodos) en una cepa exocriada de ratones. En nuestra experiencia, más del 99% de las crías lesionadas sobreviven al proceso de la cirugía hasta alcanzar la edad adulta. Evaluamos la conducta locomotora de dos grupos distintos de ratones con lesión dopaminérgica neonatal durante la cuarta semana de vida (días postnatal 22 a 25) utilizando dos “campos abiertos” diferentes (Métodos) y encontramos que sólo una porción de los ratones lesionados (31% y 43%) desarrollan el fenotipo hiperlocomotor, mientras que el resto presenta niveles de locomoción similares al grupo control (**Figura R.i.1**).



**Figura R.i.1** Respuesta locomotora de los ratones juveniles en un ambiente novedoso (campo abierto) y efecto de la amfetamina.

**A.** Respuesta locomotora en un ambiente novedoso (“campo abierto” cuadrado) al cabo de media hora de medición en dos grupos de ratones con lesión dopaminérgica neonatal (6-OHDA) y lesión neonatal simulada (Control) durante la cuarta semana de vida (día postnatal 22 a 25). Uno de los grupos fue medido en el “Campo abierto 1” de 30 cm de lado y el otro grupo en el “Campo abierto 2” de 40 cm de lado (ver métodos). La distancia recorrida fue normalizada al valor medio de los ratones control de cada camada. La distribución de valores de recorrido total en el grupo control ajustó a una distribución normal (izquierda) mientras que la distribución en el grupo de ratones lesionados no ajustó a una distribución normal (Test de normalidad Kolmogorov Smirnov  $p < 0,01$ ). Dentro del grupo de ratones lesionados, consideramos que un sujeto presentaba el fenotipo hiperlocomotor si la distancia total recorrida superaba la media más tres desvíos estándar del grupo control correspondiente. Con este criterio obtuvimos que la proporción de animales lesionados hiperlocomotores fue de 31% y 43% (Campo abierto 1 y 2 respectivamente). El recorrido total de los animales considerados hiperlocomotores fue un 70% superior al grupo control.

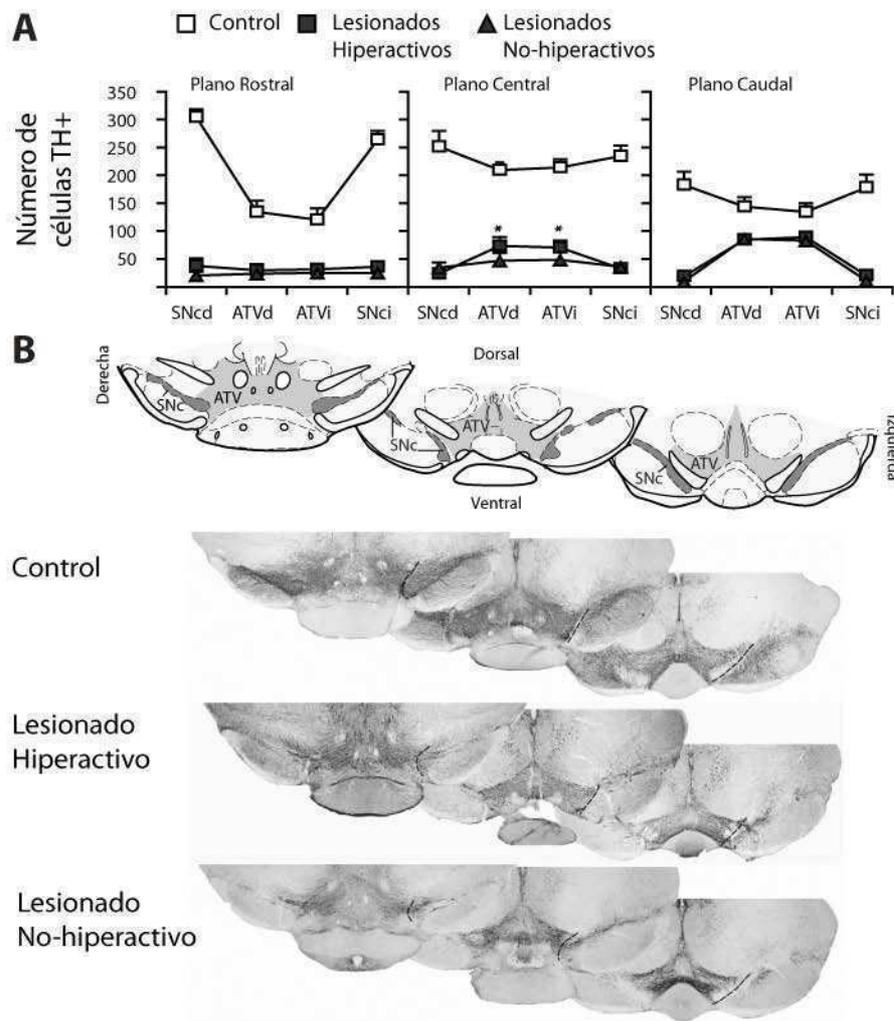
**B.** Efecto de la amfetamina (4 mg/kg, i.p.) sobre la actividad locomotora en ratones juveniles en el “campo abierto”. Los ratones fueron medidos en el “Campo abierto 2” durante 30 minutos libres de droga (locomoción basal) y seguidos de otros 30 minutos luego de la administración de la droga (efecto de la amfetamina). De acuerdo a lo esperado, encontramos que los ratones del grupo control aumentaron significativamente la actividad locomotora (Test post-hoc de Tukey:  $* p < 0,03$ ), aunque moderadamente (35% de aumento). Contrariamente, los ratones que fueron tratados con 6-OHDA neonatalmente presentaron una reducción significativa en la distancia recorrida independientemente del nivel basal de actividad. De acuerdo al criterio mencionado en la parte A de la figura, los ratones clasificados como no-hiperlocomotores redujeron su actividad en un 50% (Test post-hoc de Tukey:  $* p < 0,01$ ) y los hiperlocomotores un 75% (Test post-hoc de Tukey:  $* p < 0,001$ ).

Las comparaciones post-hoc fueron realizadas luego de una interacción significativa ( $p < 0,001$ ) entre el factor lesión y el factor droga de una ANOVA de dos vías con medidas repetidas. En esta figura,  $N=4$  en cada grupo. Las barras representan la media y el error estándar.

La lesión dopaminérgica neonatal ha sido propuesta como modelo de la condición psiquiátrica infantil ADHD dado que reproduce varios aspectos clave de la enfermedad en humanos (Breese y col. 2005; van der Kooij y Glennon 2007). En particular, tanto en ratas como ratones, la hiperactividad observada durante la infancia, puede ser revertida con la administración de psicoestimulantes como la amfetamina y el metilfenidato que aumentan la disponibilidad extracelular de aminas biógenas. Esta respuesta fue considerada por algunos autores un “efecto paradójal” de los psicoestimulantes y le confiere un valor predictivo a la lesión neonatal como modelo de ADHD (Shaywitz y col. 1976b; van der Kooij y

Glennon 2007). Sin embargo, no queda claro si se trata de un efecto específicamente “anti-hiperlocomotor” o de un efecto “hipolocomotor” generalizado a la lesión neonatal. Para evaluar esta posibilidad, estudiamos el efecto agudo de la anfetamina sobre la conducta locomotora en el campo abierto en ratones control y lesionados que desarrollaron o no hiperlocomoción. Encontramos que los ratones control responden a la anfetamina con un aumento significativo de la locomoción, mientras que los ratones con lesión dopaminérgica neonatal disminuyeron la actividad locomotora independientemente del nivel basal de actividad (**Figura R.i.1**), sugiriendo que la anfetamina tiene un efecto hipolocomotor general en los ratones con destrucción de las vías dopaminérgicas.

A continuación caracterizamos los efectos de la administración de 6-OHDA en términos del grado de destrucción de neuronas dopaminérgicas. Para ello, cuantificamos en secciones mesencefálicas de ratones control y lesionados el número de neuronas que expresan la enzima tirosina hidroxilasa (TH), indispensable para la biosíntesis de las catecolaminas. De manera consistente con datos previos (Avale y col. 2004a), encontramos que la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la región mesencefálica de los ratones lesionados fue superior al 80% en la Sustancia Negra mientras que la pérdida en el Área Tegmental Ventral fue menos marcada (entre el 30% y el 80%), especialmente en regiones más caudales del mesencéfalo (Figura R.i.2). Sin embargo, no encontramos diferencias estadísticas dentro del grupo lesionado entre los ratones hiperlocomotores y no-hiperlocomotores.



**Figura R.i.2. Extensión de la lesión dopaminérgica neonatal en ratones hiperlocomotores y no-hiperlocomotores a nivel mesencefálico**

**A.** Cuantificación del número basal de neuronas mesencefálicas con marca inmunorreactiva para la enzima tirosina hidroxilasa (TH, ver Métodos) en ratones control y del número de neuronas TH+ remanentes luego del tratamiento neonatal con 6-OHDA. La cuantificación de neuronas fue realizada en secciones de 40  $\mu\text{m}$  de espesor en la Sustancia Negra parte compacta derecha/izquierda (SNcd/SNci) y en el Área Tegmental Ventral derecha/izquierda (ATVd/ATVi) en tres planos coronales distintos a lo largo del eje rostrocaudal: Plano rostral, Plano Central, Plano Caudal, correspondientes aproximadamente a los planos estereotáxicos Bregma -3,00, -3,28 y -3,52 (Franklin y Paxinos 2001). Encontramos una pérdida significativa de neuronas TH+ tanto en la SN como en el ATV de todos los ratones lesionados independientemente del fenotipo locomotor expresado (Test post-hoc de Tukey  $p < 0,001$ ). La pérdida de neuronas TH+ en la SN fue mas intensa que en el ATV y dentro del ATV la pérdida fue mayor en secciones rostrales que caudales. Notar que el grado de pérdida de neuronas es simétrico respecto del plano interhemisférico y es comparable entre los ratones lesionados hiperlocomotores y no-hiperlocomotores. El análisis estadístico indicó que sólo en el plano central del ATV la pérdida de neuronas fue mayor en el grupo no-hiperlocomotor que en el grupo hiperlocomotor (\*, Test post-hoc de Tukey  $p < 0,05$ ).

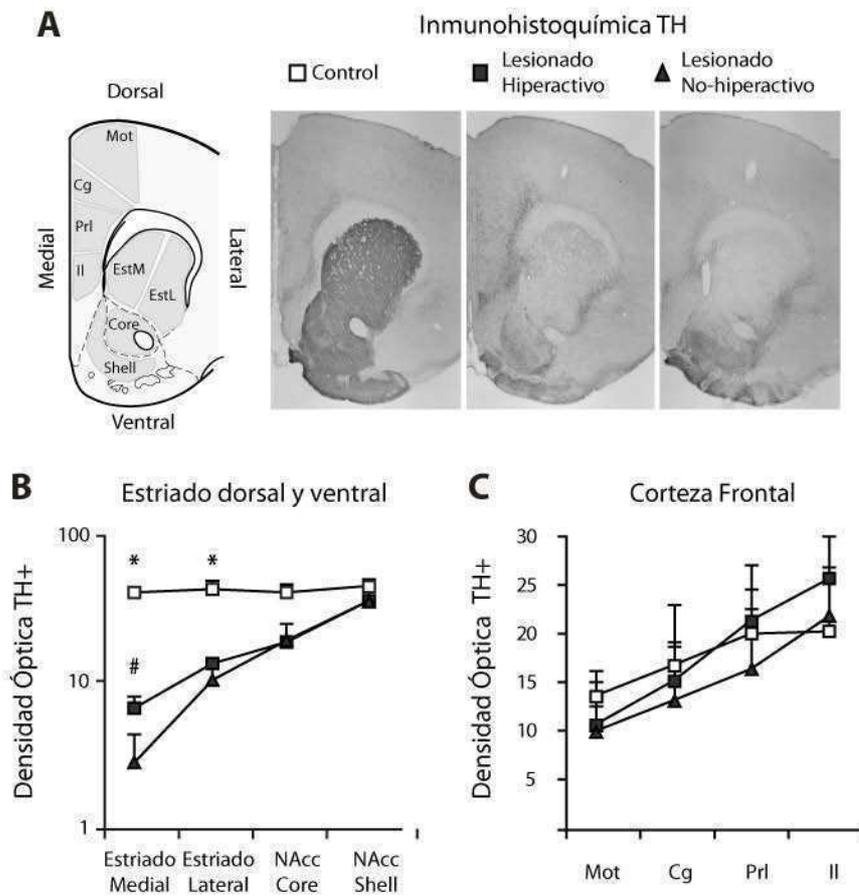
Los datos representan la media  $\pm$  el error estándar. Para cada plano estereotáxico realizamos un ANOVA de dos vías con medidas repetidas. Las comparaciones post-hoc fueron realizadas luego de un efecto principal de la lesión significativo ( $p < 0,001$ ) para los planos rostral y caudal y luego de una interacción significativa entre la lesión y las estructura estudiadas ( $p < 0,04$ ) para el plano central.

**B.** En la fila superior, esquemas coronales (modificados de Franklin y Paxinos, 2001) de la región mesencefálica ventral donde se encuentran la Sustancia Negra parte compacta (SNc) y el Área Tegmental Ventral (ATV). En los esquemas, la estructura sombreada de gris intenso corresponde a la región donde contabilizamos células TH+ pertenecientes a la SNc y la estructura sombreada de gris intermedio corresponde a el ATV. Las fotomicrografías de las filas inferiores corresponden a las secciones de tejido original de 3 ejemplares distintos luego de la reacción inmunohistoquímica contra la tirosina hidroxilasa en donde se cuantificó el número de células TH+. Los esquemas y las fotomicrografías corresponden, de izquierda a derecha, a los planos estereotáxicos aproximados a Bregma -3,00; -3,28 y -3,52. Se contó en cada estructura todos los somas de células que tuvieran núcleo y al menos un proceso.

Las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas proyectan al prosencéfalo, especialmente al estriado dorsal (desde de la Sustancia Negra) y el Núcleo Accumbens, pero también a la región medial frontal de la corteza (desde el Área Tegmental Ventral; Lammel y col. 2008). Estudiamos la pérdida de innervación dopaminérgica en estas regiones en los ratones lesionados mediante la medición de la densidad óptica de secciones inmunomarcadas contra la enzima TH.

De acuerdo a lo esperado, la pérdida de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas está acompañada de una reducción masiva de marca inmunorreactiva contra la enzima TH en el prosencéfalo. Esta disminución sigue un gradiente consistente con la topografía de las proyecciones dopaminérgicas mesencefálicas, con mayor pérdida en la región dorsal del Estriado que en la región del Núcleo Accumbens y sin pérdida en la región frontal de la corteza (**Figura R.i.3**). Un estudio regionalizado reveló que la pérdida de marca TH+ es ligeramente mayor en el grupo de ratones lesionados no-hiperactivos en la región medial del estriado, sugiriendo una denervación dopaminérgica más severa en este subgrupo de animales.

Además de la pérdida de neuronas dopaminérgicas, es sabido que el tratamiento neonatal con 6-OHDA trae aparejadas adaptaciones neuroquímicas y moleculares en regiones del prosencéfalo (ver Introducción). Entre ellas, un mecanismo compensatorio ampliamente documentado es la hiperinnervación estriatal por fibras serotoninérgicas (Davids y col. 2002). Investigamos este mecanismo compensatorio en nuestro modelo mediante la medición de la densidad óptica en secciones inmunomarcadas contra el transportador de serotonina (SERT) que está presente en los procesos de neuronas serotoninérgicas, especialmente en los axones. Encontramos que tanto los ratones hiperlocomotores como los no-hiperlocomotores presentan un aumento notable de la marca SERT+ (~200%) en la región dorsal del estriado, mientras que la densidad óptica en el Núcleo Accumbens y en la corteza frontal es comparable a la del grupo control (**Figura R.i.4**). Aunque no encontramos diferencias estadísticas ( $p=0,09$ ), observamos que existe una tendencia en los ratones no-hiperlocomotores a una mayor compensación serotoninérgica en el estriado y Núcleo Accumbens en comparación con los ratones que desarrollan hiperlocomoción (**Figura R.i.4**).

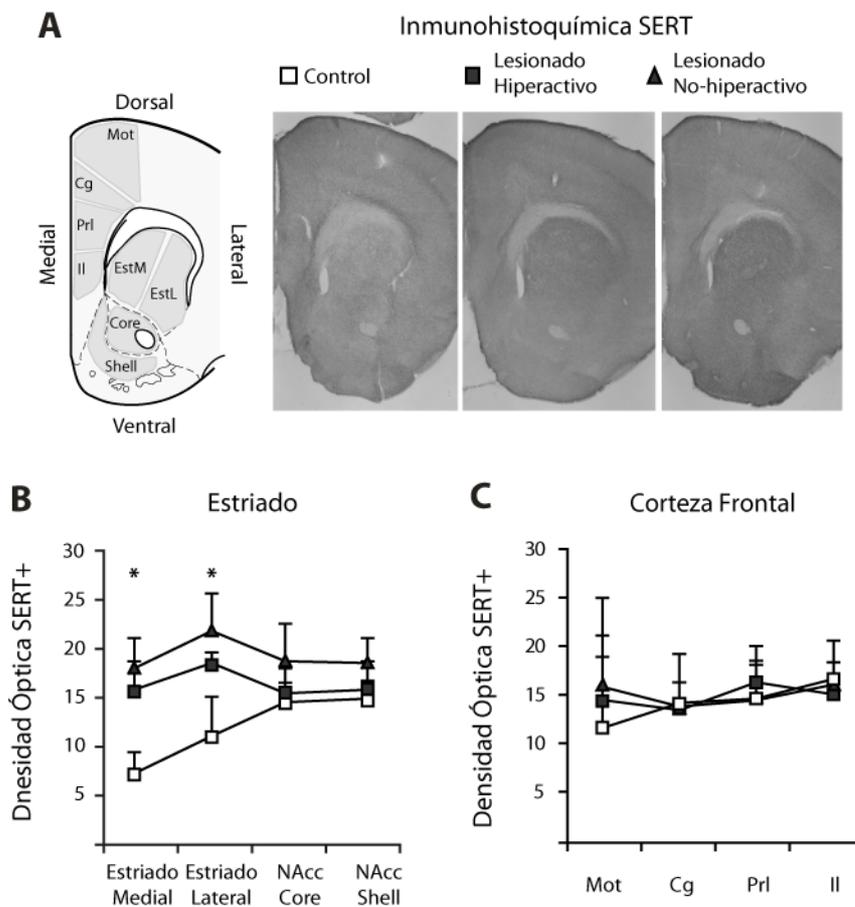


**Figura R.i.3. Cuantificación de la extensión de la lesión dopaminérgica neonatal a nivel prosencefálico**

**A.** *Izquierda.* Esquema coronal (modificado de Franklin y Paxinos, 2001) de la región rostral del prosencefalo de ratón. En gris oscuro están delimitadas las regiones en donde se realizaron las mediciones de densidad óptica (Mot: corteza motoroa, Cg, corteza cíngular, Pri: corteza prelímbica, II: corteza infralímbica, EstM: estriado medial, EstL: estriado lateral, Core: Núcleo Accumbens región "core", Shell: Núcleo Accumbens región "shell"). *Derecha.* Fotomicrografías de secciones correspondientes al plano esquematizado a la izquierda pertenecientes a un ratón control (izquierda), lesionado hiperactivo (medio) y lesionado no-hiperactivo (derecha). Las secciones fueron procesadas inmunohistoquímicamente para detectar la enzima tirosina hidroxilasa (TH).

**B.** Densidad óptica relativa (ver Métodos) en cuatro regiones estriatales de interés. Encontramos que los ratones lesionados presentaron una pérdida de marca TH+ en el estriado más marcada que en el Núcleo Accumbens (\*  $p < 0,05$  Test post-hoc de Tukey entre el grupo control y cada uno de los grupos lesionados). Entre los animales lesionados la pérdida de marca fue mayor en el estriado medial del ratones no-hiperlocomotores (#  $p < 0,05$  Test post-hoc de Tukey).

**C.** Densidad óptica relativa en regiones corticales de la corteza frontal. La densidad de marca inmunorreactiva presenta un gradiente creciente desde regiones dorsales a ventrales. No encontramos diferencias entre los grupos experimentales. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar. Las comparaciones post-hoc fueron realizadas luego de una interacción significativa entre la lesión y las estructuras estudiadas ( $p < 0,001$ ) en una ANOVA de dos vías con medidas repetidas.



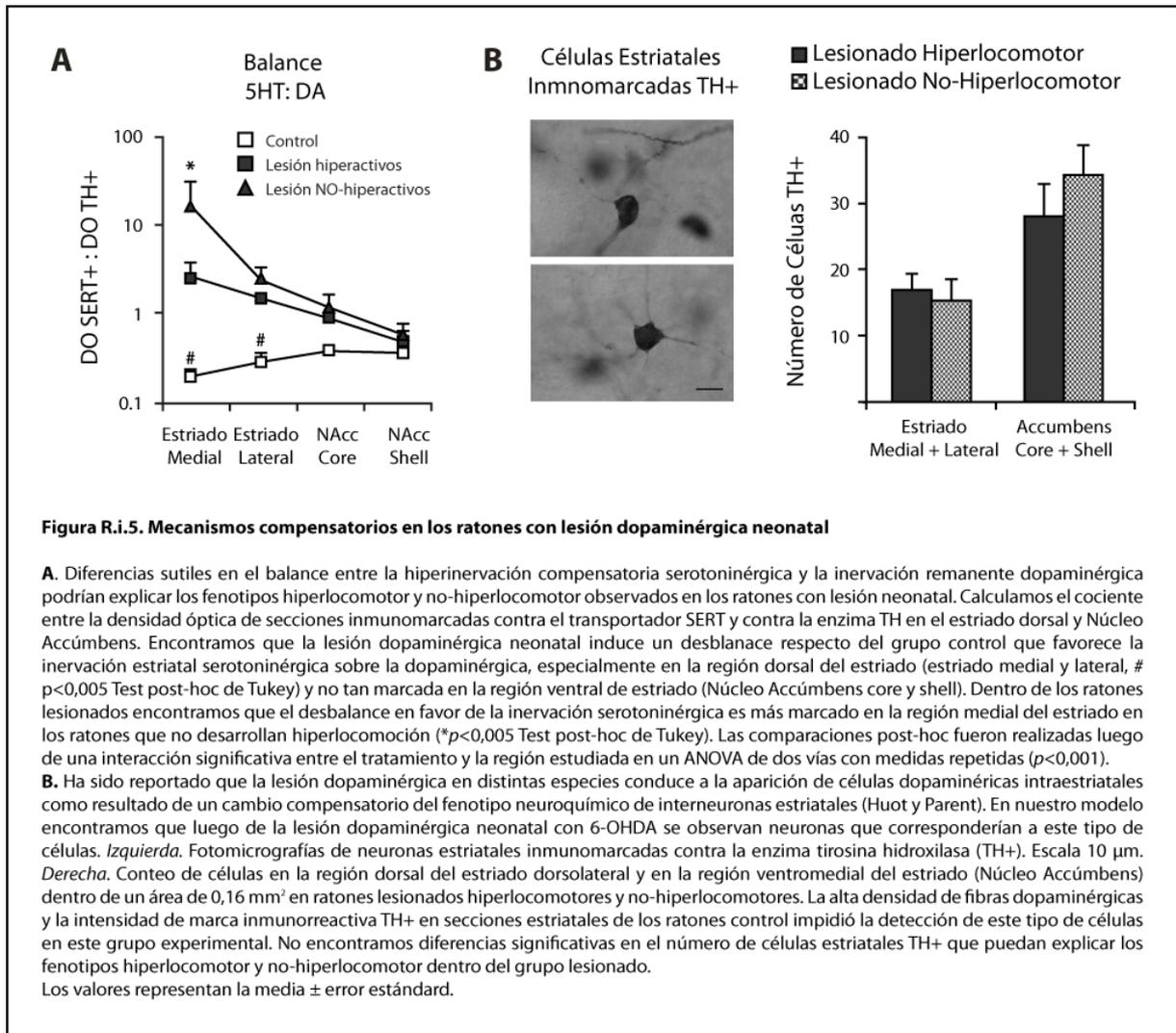
**Figura R.i.4. Mecanismos compensatorios de la lesión dopaminérgica neonatal**

**A.** *Izquierda.* Igual que en la Figura R.i.3: Esquema coronal (modificado de Franklin y Paxinos, 2001) de la región rostral del prosencéfalo de ratón. *Derecha.* Fotomicrografías de secciones correspondientes al plano esquematizado a la izquierda pertenecientes a un ratón control (izquierda), lesionado hiperactivo (medio) y lesionado no-hiperactivo (derecha). Estas secciones coronales fueron procesadas por inmunohistoquímica para detectar el transportador de serotonina (SERT). Seleccionamos cortes contiguos a los utilizados en el estudio de innervación dopaminérgica remanente de la Figura R.i.3.

**B.** Densidad óptica relativa (ver Métodos) en cuatro regiones estriatales de interés. Encontramos que los ratones lesionados presentan una marca más intensa de SERT en la región dorsal del estriado (estriado medial y estriado dorsal) respecto del grupo control, pero no presentan diferencias a nivel del Núcleo Accumbens (\*  $p < 0,05$  Test post-hoc de Tukey entre el grupo control y cada uno de los lesionados). Dentro de los animales lesionados la densidad de marca parece ser mayor a lo largo de todas las regiones estriatales (estriado y Núcleo Accumbens) en el grupo lesionando no-hiperactivo, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas ( $p < 0,09$  grupo hiperlocomotor versus no-hiperlocomotor).

**C.** Densidad óptica relativa en regiones corticales de la corteza frontal. No encontramos diferencias entre los grupos experimentales.

Los datos representan la media  $\pm$  error estándar. Las comparaciones post-hoc fueron realizadas luego de una interacción significativa entre la lesión y las estructuras estudiadas ( $p < 0,001$ ) en una ANOVA de dos vías con medidas repetidas



Esta última observación sugirió que el balance entre la pérdida de innervación dopaminérgica y la hiperinervación serotoninérgica podía reflejar diferencias neuroquímicas asociadas a los fenotipos locomotores de los ratones lesionados. Para ilustrar dicho balance, estudiamos el cociente entre la densidad óptica del transportador de serotonina (DO-SERT) y de la tirosina hidroxilasa (DO-TH) y encontramos que los ratones que no desarrollan hiperlocomoción luego de la lesión neonatal tienen un cociente DO-SERT:DO-TH varias veces más elevado que los que desarrollan hiperlocomoción (Figura R.i.5), sugiriendo que sutiles diferencias en el grado de denervación dopaminérgica e hiperinervación serotoninérgica podrían conducir a los diferentes fenotipos locomotores observados. Por último, también cuantificamos el número de neuronas TH+ estriales que ocurre compensatoriamente a la lesión dopaminérgica (Huot y Parent 2007) en los ratones lesionados, pero no

encontramos diferencias significativas que expliquen las diferencias conductuales observadas (**Figura R.i.5**)

En esta sección mostramos que la implementación del modelo de lesión dopaminérgica neonatal reproduce las características principales descritas previamente por otros autores (Avalé y col. 2004a). La administración neonatal de 6-OHDA en ratones induce una pérdida extensa de neuronas TH+ en la Sustancia Negra (región A9) y una pérdida menos severa en el Área Tegmental Ventral (región A10). Esta pérdida está acompañada de una disminución severa de la inmunorreactividad para la enzima TH en la región dorsal del estriado y una reducción menos severa en el Núcleo Accumbens, junto con una hiperinervación serotoninérgica de la región dorsal del estriado

En cuanto a la conducta, reportamos que sólo una parte de los ratones lesionados presentan hiperactividad locomotora. La “efectividad” de la lesión neonatal en términos de la aparición del fenotipo hiperlocomotor es variable entre los distintos grupos de investigación y las características de los ratones lesionados no-hiperlocomotores son raramente reportadas. En nuestra experiencia, la falta de hiperactividad no es el resultado de una lesión incompleta ya que el grado de denervación dopaminérgica es comparable entre los ratones hiperlocomotores y no-hiperlocomotores. También es importante destacar que luego de la cirugía neonatal, los ratones control y lesionados son criados juntos con las mismas madres y que dentro de una misma camada es común encontrar ratones lesionados hiperlocomotores y no-hiperlocomotores, indicando que el desarrollo del fenotipo conductual no podría deberse a diferencias en la crianza. Por el contrario, encontramos que la administración de 6-OHDA induce un desbalance más marcado entre la inervación estriatal compensatoria de fibras serotoninérgicas y la inervación remanente de fibras dopaminérgicas que podría explicar el fenotipo de los ratones no-hiperlocomotores. Es interesante notar que la lesión dopaminérgica por 6-OHDA sumada a una lesión serotoninérgica posterior agrava la hiperactividad en ratas (Brus y col. 2004), indicando que tal vez una compensación serotoninérgica más intensa podría

tener un efecto hipolocomotor más potente que contrarrestaría la hiperlocomoción inducida por la lesión con 6-OHDA.

Por otro lado, reportamos por primera vez que la anfetamina ejerce un efecto hipolocomotor sobre todos los ratones con lesión dopaminérgica independientemente del nivel basal de actividad locomotora. En este sentido, es importante destacar que la anfetamina aumenta la concentración extracelular de monoaminas incluyendo dopamina, pero también serotonina y noradrenalina (Rothman y Baumann 2003) y que ha sido propuesto que los psicoestimulantes reducen la locomoción en animales lesionados con 6-OHDA a través de la inhibición del transportador de serotonina y noradrenalina (Davids y col. 2002; Russell y col. 2005). En tal sentido, la abundante hiperinervación serotoninérgica estriatal que ocurre en los animales lesionados tanto hiperlocomotores como no-hiperlocomotores es consistente con el mecanismo de acción propuesto para la hipolocomoción inducida por psicoestimulantes. Por otro lado, en los ratones control -cuyas vías dopaminérgicas están intactas- se cree que la locomoción está regulada normalmente por la dopamina y que el efecto hiperlocomotor de los psicoestimulantes podría deberse a un aumento extracelular de dopamina (Wilkinson y col. 1993).

La lesión dopaminérgica neonatal en ratas ha sido ampliamente estudiada como modelo de ADHD ya que aporta información relevante acerca de los mecanismos que causan la hiperactividad (Sagvolden y col. 2005b). El modelo carecería de validez constructiva o “etiológica”, ya que no hay evidencia de una pérdida neuronal significativa en ADHD. Sin embargo diversas teorías abonan la idea de un estado hipodopaminérgico en ADHD, y estudios recientes muestran una reducción de marcadores dopaminérgicos en pacientes (Volkow y col. 2009). Por otro lado, el modelo muestra cierta validez fenotípica y predictiva. Además de la hiperactividad motora y de la respuesta atípica a los psicoestimulantes reproducidas en nuestro modelo, es sabido que la lesión neonatal con 6-OHDA produce déficit atencional y disminución de la inhibición conductual, rasgos que se encuentran en los pacientes con ADHD (Avale y col. 2004a; Breese y col. 2005; van der Kooij y Glennon 2007) . Por lo tanto, la aparición del fenotipo hiperlocomotor sea tal vez sólo un resultado posible de la lesión neonatal con 6-OHDA y otros fenotipos conductuales se expresen en ratones no-hiperlocomotores.

Sugestivamente, los síntomas del ADHD se agrupan conformando dos o tres subtipos de la enfermedad en la que no todos presentan hiperactividad, sino que se caracterizan de acuerdo a la presencia de hiperactividad/impulsividad o déficit atencional (DSM-IV).

La lesión neonatal por 6-OHDA, entonces, ha sido relevante en el campo de la neurociencia para modelar distintos aspectos del ADHD y para entender aspectos de la fisiopatología de la enfermedad (Castellanos y Tannock 2002), pero también es un modelo atractivo para entender aspectos más generales de la biología del neuro-desarrollo (Breese y col. 2005) y el estudio de la influencia de las vías dopaminérgicas sobre la maduración del sistema córticoestriatal y sobre el procesamiento de información en los Ganglios de la Base. Sin embargo, a pesar de ser un modelo ampliamente estudiado, existen pocos estudios del funcionamiento de los circuitos involucrados (Nyakas y Van Delft 1975; Onn y col. 1990; Luthman y col. 1993)

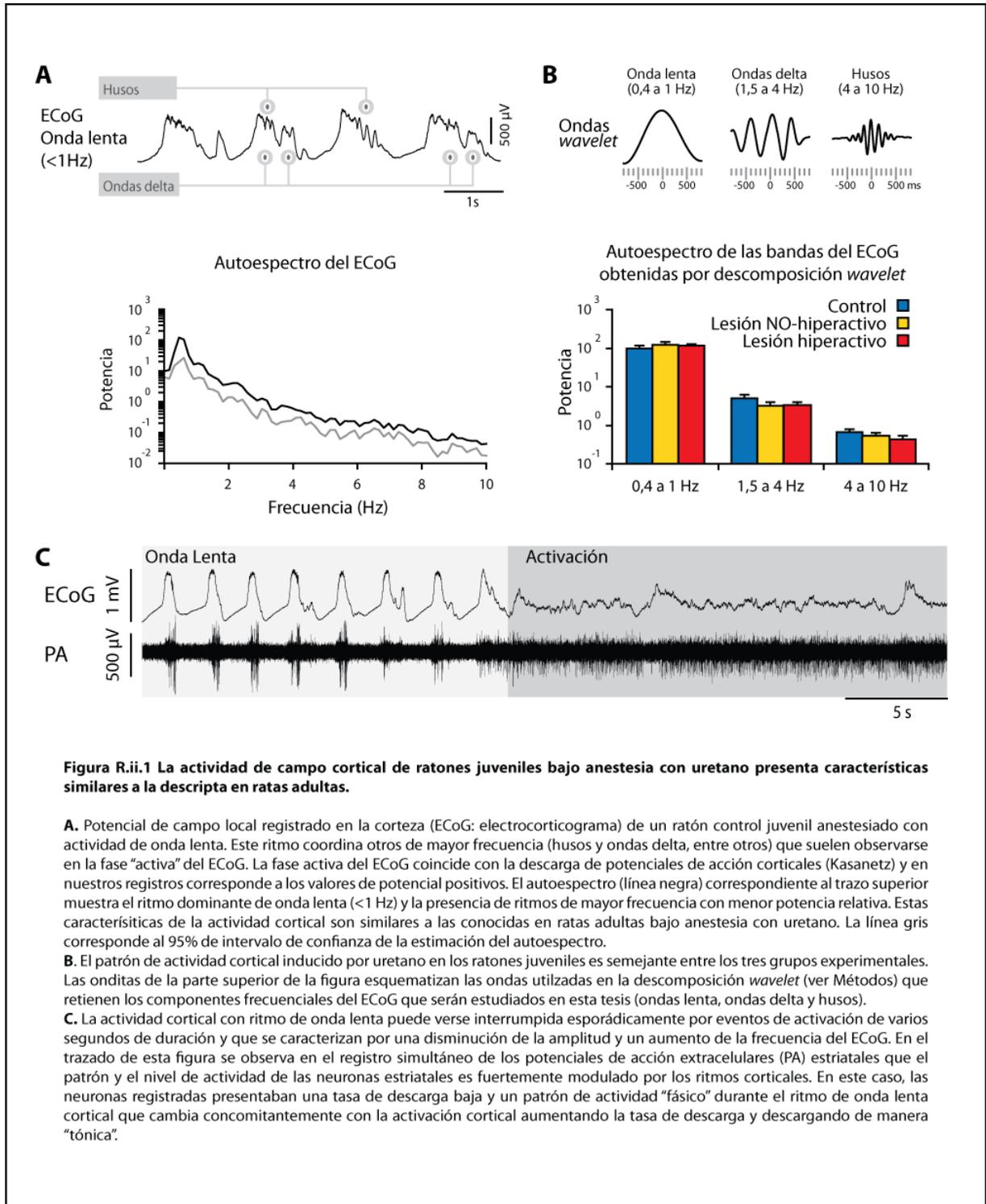
## Sección II

### *Los animales con lesión dopaminérgica neonatal que desarrollan hiperlocomoción presentan una disminución en el acople temporal de la actividad eléctrica cortical y estriatal*

El objetivo de este experimento fue determinar si la lesión dopaminérgica neonatal producía alteraciones funcionales a nivel de los circuitos córticoestriatales que estuvieran asociadas al fenotipo hiperlocomotor y no-hiperlocomotor observado luego de la lesión neonatal. Para ello seleccionamos ratones evaluados conductualmente en el campo abierto y los dividimos en tres grupos para electrofisiología: animales lesionados que desarrollaron hiperlocomoción, animales lesionados que no desarrollaron hiperlocomoción y animales control. Los experimentos electrofisiológicos los llevamos a cabo entre 2 y 5 días después de la evaluación conductual (edad: 28 a 32 días postnatal), durante un período en el que esta alteración conductuales todavía persiste (Avale y col. 2004a).

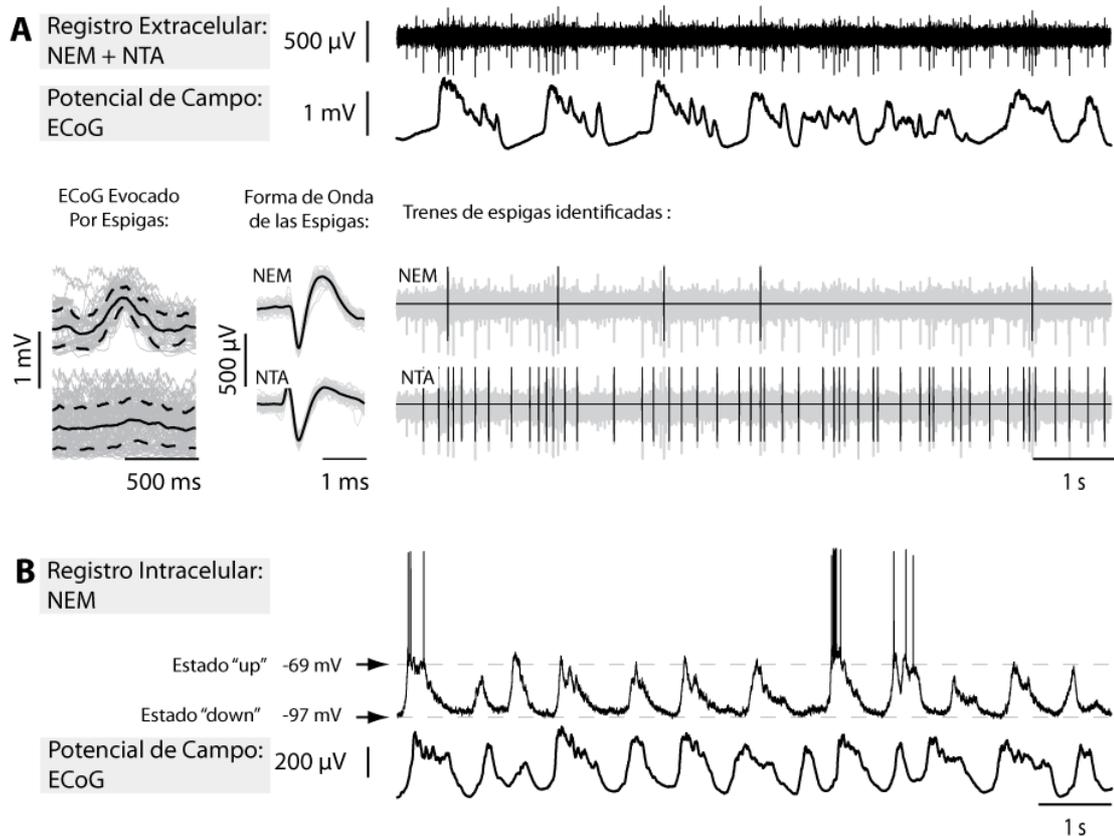
Realizamos registros electrofisiológicos *in vivo* bajo anestesia con uretano. Si bien existe bastante literatura de este tipo de registros en los ganglios de la base de ratas adultas, existen muy pocos reportes de registros en ratones o en animales juveniles. En este sentido, encontramos que la actividad de campo cortical (electrocorticograma) inducida por uretano en ratones control y lesionados presenta características semejantes a las conocidas en ratas. La actividad dominante que observamos a lo largo de nuestros experimentos (**Figura R.ii.1**) es un ritmo de onda lenta (0,4-1 Hz; Steriade 2000) que coordina oscilaciones de mayor frecuencia: ondas delta (1,5-4Hz) y "husos de sueño" (4-10 Hz), que ocurren en la fase "activa" del electrocorticograma (Kasanetz y col. 2006). Este ritmo suele ser interrumpido esporádicamente por eventos de "activación" caracterizados por una disminución en la amplitud y un aumento de la frecuencia del electrocorticograma. Mediante el registro simultáneo de potenciales de acción estriatales encontramos que la mayor parte de dichas neuronas tienen baja tasa de disparo (menos de una descarga por segundo) y que el patrón de descarga es fuertemente modulado por el estado general de actividad de la corteza (**Figura R.ii.1**). En general estos hallazgos muestran

que la actividad cortical y estriatal bajo anestesia en ratones juveniles es comparable a la de ratas adultas.



A continuación, decidimos cuantificar la modulación cortical sobre la actividad estriatal estudiando el enganche de fase de las descargas de potenciales de acción estriatales con los ritmos corticales espontáneos (Métodos). Como mencionamos anteriormente, en roedores anestesiados, la actividad de la corteza presenta oscilaciones de baja frecuencia que coordinan ondas de mayor frecuencia. Este patrón de actividad se asemeja al observado durante la fase de "onda lenta" del sueño natural (Steriade 2000; Mahon y col. 2006) y por lo tanto **nos proporciona una señal biológica con características fisiológicas para estudiar el acople funcional córtico-estriatal**. Cabe mencionar en este punto que existió una visión según la cual las fluctuaciones espontáneas de la actividad del cerebro durante el reposo (es decir, en ausencia de estímulos sensoriales) eran consideradas ruido que no conllevaba ningún tipo de información. Sin embargo, actualmente se piensa que la actividad espontánea del cerebro durante la vigilia y el sueño es parte importante de distintos procesos cerebrales, como por ejemplo el *replay* y la consolidación de memorias durante el sueño, y que la conectividad funcional de la red en su estado de reposo refleja su historia de activación e influye sobre la respuesta al entorno (Huber y col. 2004; Raichle 2006; Destexhe y col. 2007) .

Para estudiar separadamente el enganche de fase córtico-estriatal a distintas frecuencias de interés seleccionamos tramos de señal con actividad de onda lenta cortical, y descompusimos el electrocorticograma en tres bandas que retuvieran la actividad de onda lenta, las ondas delta y los husos de sueño (*banda 1, 2 y 3* respectivamente; **Cuadro M.2**, Métodos). De manera similar a lo que sucede en ratas adultas, la actividad de las neuronas estriatales está fuertemente modulada por los ritmos corticales (**Figura R.ii.2**). Esta modulación se refleja en un enganche de fase significativo (**Cuadro M.1**, Métodos: Enganche de fase) con la *banda 1* para la mayoría (95%) de las neuronas estriatales tanto en los ratones control, como los que habían recibido lesión con 6-OHDA (**Figura R.ii.3**). Este resultado no resulta muy sorprendente si tenemos en cuenta que la entrada excitatoria cortical de onda lenta comanda la transición del estado "*down*" hacia el estado "*up*" de las NEMs (**Figura R.ii.2**, Kasanetz y col. 2006) y que estas neuronas son capaces de disparar potenciales de acción únicamente en este estado (Wilson y Groves 1981; Wilson 1993).



**Figura R.ii.2 La mayor parte de las neuronas estriatales están fuertemente moduladas por los ritmos de onda lenta corticales.**

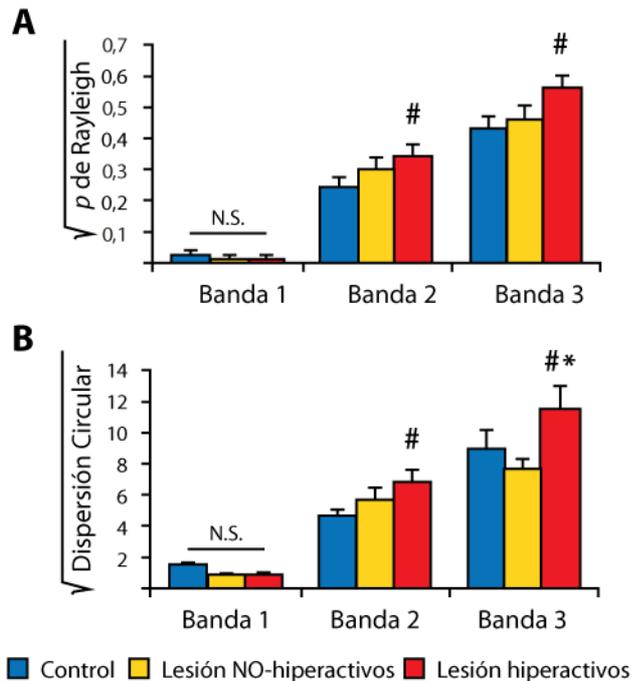
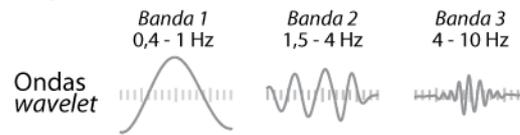
**A.** Los trazos superiores en negro corresponden a registros simultáneos de la actividad multiunitaria extracelular estriatal (potenciales de acción) y de la actividad de campo local cortical (electrocorticograma, ECoG) en un ratón anestesiado juvenil. La señal estriatal multiunitaria fue registrada con un multielectrodo y procesada con un algoritmo de clasificación (wave clus, Métodos) y se rescataron los potenciales de acción provenientes de dos unidades distintas. En gris, la misma señal multiunitaria de los trazos superiores con los trenes de espigas superpuestos (palitos negros) correspondientes a las unidades clasificadas con el wave clus. De acuerdo a la forma de onda de las espigas y el patrón de descarga, las unidades clasificadas corresponden probablemente a una Neurona Espinosa Mediana (NEM) y una Neurona Tónicamente Activa (NTA). Notar que la NTA descarga a lo largo de todas las fases de la onda lenta del ECoG mientras que la actividad de la NEM parece estar modulada más fuertemente por el ritmo de onda lenta cortical y descarga sólo durante la fase activa del ECoG. A la izquierda se puede apreciar que el promedio del ECoG evocado por las espigas de la NEM (promedio: línea negra continua; desvío estándar: líneas negras punteadas) recupera un ciclo de onda lenta, mientras que el promedio evocado por las espigas de la NTA es plano, indicando que los potenciales de acción de esta unidad ocurren sin una preferencia marcada por alguna fase de la onda lenta. Sólo un pequeño porcentaje (1 %) de las neuronas registradas para los experimentos de esta tesis presentaron patrones de descarga y espigas con formas de onda compatibles con NTA. El resto de las neuronas registradas presentaron patrones de descarga fuertemente modulados por la onda lenta cortical.

**B.** Los trazos inferiores corresponden al registro simultáneo del potencial de membrana de una NEM y del ECoG en un ratón anestesiado. La actividad subumbral de la NEM está fuertemente comandada por las oscilaciones de onda lenta corticales, resultando en la alternancia entre dos estados característicos de este tipo de neuronas: un estado muy hiperpolarizado llamado down y otro más despolarizado llamado up. Las NEMs sólo descargan potenciales de acción en el estado up. (Wilson, Kasanetz)

Entonces, este resultado sugiere que en los ratones juveniles el conexionado grosero córticoestriatal es funcionalmente activo, que probablemente los estados *up* y *down* de las NEMs ya son maduros hacia la cuarta semana de vida (Tepper y col. 1998), y que el desarrollo de estos estados ocurre independientemente de la integridad del sistema dopaminérgico nigroestriatal.

Dado que las NEMs sólo disparan potenciales de acción durante el estado *up*, las despolarizaciones en meseta del potencial de membrana registradas intracelularmente son interpretadas como eventos habilitadores del procesamiento de información cortical (O'Donnell y col. 1999). Por otro lado, las vías dopaminérgicas podrían controlar la precisión temporal con que las neuronas estriatales descargan potenciales de acción dentro de cada estado *up* (Rolls y col. 1984; DeFrance y col. 1985). Por lo tanto, decidimos estudiar si la disponibilidad de dopamina durante el desarrollo postnatal puede afectar la capacidad de las neuronas estriatales de reconocer ritmos corticales de mayor frecuencia (*bandas 2 y 3*) y encontramos que la lesión dopaminérgica neonatal reduce selectivamente el enganche de fase en comparación con los ratones del grupo control sólo en aquellos ratones que habían desarrollado hiperlocomoción. Contrariamente, el grado de enganche de fase en el grupo de ratones lesionados que no desarrollaron fenotipo hiperlocomotor es indistinguible del grupo control (**Figura R.ii.3**). Este resultado sugiere que la lesión dopaminérgica asociada a la aparición de un fenotipo hiperlocomotor induce un fenotipo electrofisiológico de conectividad córticoestriatal propio **caracterizado por un control cortical menos estricto sobre la temporalidad de la descarga de las neuronas estriatales.**

### Enganche de fase córticoestriatal:



**Figura R.ii.3 La lesión dopaminérgica neonatal disminuye el enganche de fase córticoestriatal a ritmos de 2 a 10 Hz en los ratones juveniles lesionados hiperlocomotores.**

Realizamos registros electrofisiológicos bajo anestesia en ratones juveniles control, lesionados hiperactivos y lesionados no-hiperactivos. Registramos simultáneamente 12 sitios estriales utilizando un multielectrodo implantado en la región dorsolateral del estriado junto con el ECoG de la corteza frontal. La señal estriatal registrada fue procesada con un algoritmo de clasificación (wave clus) para extraer las espigas de las unidades estriales. Los trenes de potenciales de acción fueron utilizados para el estudio del enganche de fase córticoestriatal (Métodos). Analizamos separadamente la dispersión circular y el estadístico  $p$  de Rayleigh para las bandas 1 2 y 3 del ECoG.

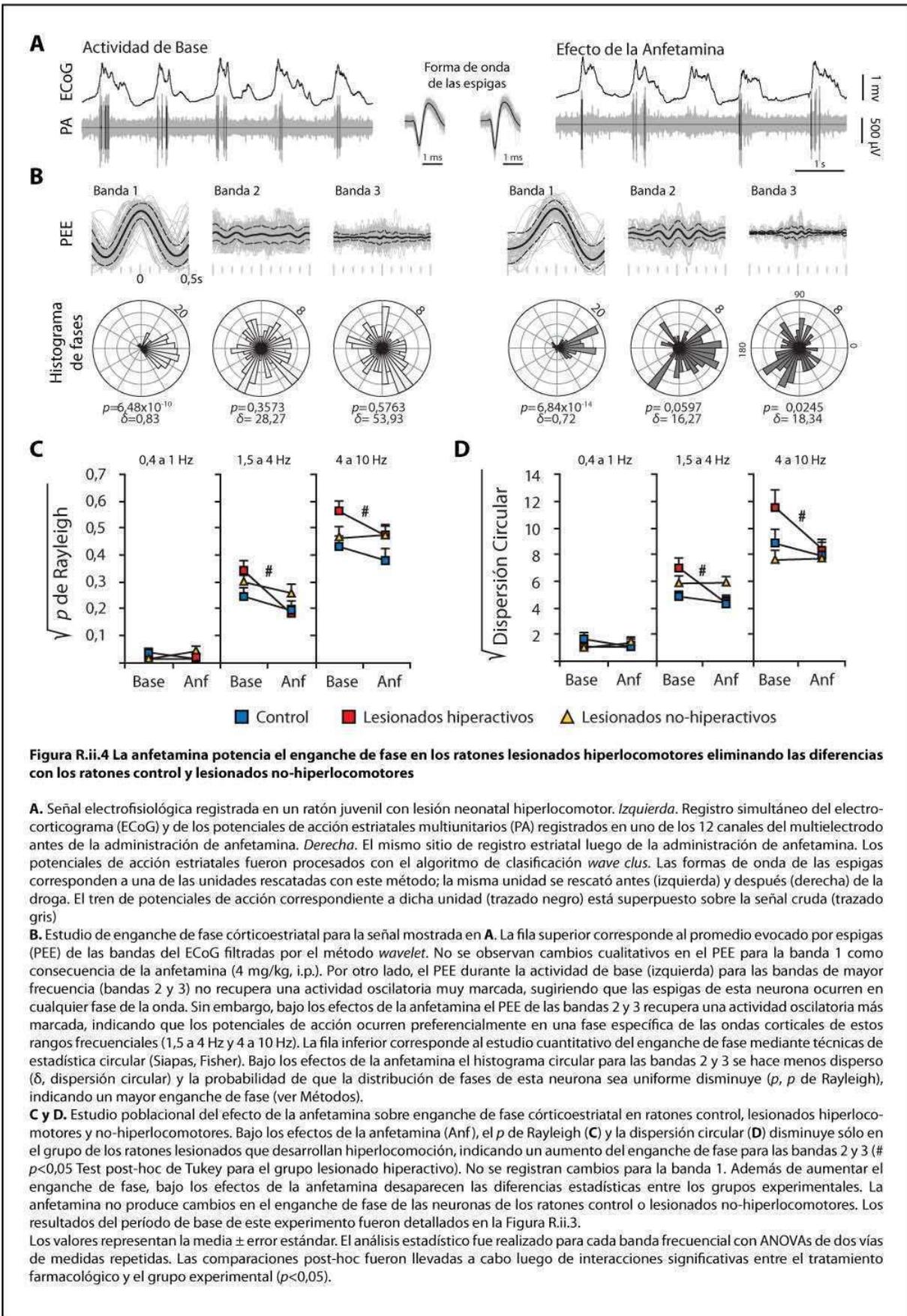
**A.** Encontramos que el  $p$  de Rayleigh para la banda 1 fue menor a 0,01 para la mayoría de las neuronas estriales sugiriendo un enganche de fase córticoestriatal significativo con los ritmos corticales de onda lenta y comparable entre los tres grupos experimentales. Sin embargo, al estudiar ritmos de mayor frecuencia (banda 2 y 3), encontramos que los ratones con lesión dopaminérgica neonatal hiperactivos (barra roja) mostraron valores de  $p$  de Rayleigh significativamente más elevados que los ratones control ( $\# p < 0,05$  Test post-hoc de Tukey), sugiriendo que el enganche de fase en este grupo está disminuido. El grupo de ratones lesionados no-hiperactivos presentó valores de  $p$  de Rayleigh similares a los del grupo control.

**B.** De manera similar a lo que ocurrió con el  $p$  de Rayleigh, la dispersión circular para la banda 1 fue comparable entre los tres grupos experimentales. Al estudiar rangos frecuenciales más altos, encontramos que la dispersión de fases del grupo de ratones lesionados hiperactivos era significativamente mayor que la del grupo control ( $\# p < 0,05$  Test post-hoc de Tukey). También encontramos que la dispersión de fases en la banda 3 (4 a 10 Hz) fue significativamente mayor en comparación con los ratones lesionados no-hiperactivos ( $*p < 0,05$  Test post-hoc de Tukey).

Debido al diseño experimental, los resultados de esta figura fueron analizados estadísticamente junto con los resultados de la Figura R.ii.4 mediante un ANOVA de medidas repetidas. Ver detalles en Figura R.ii.4. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar.

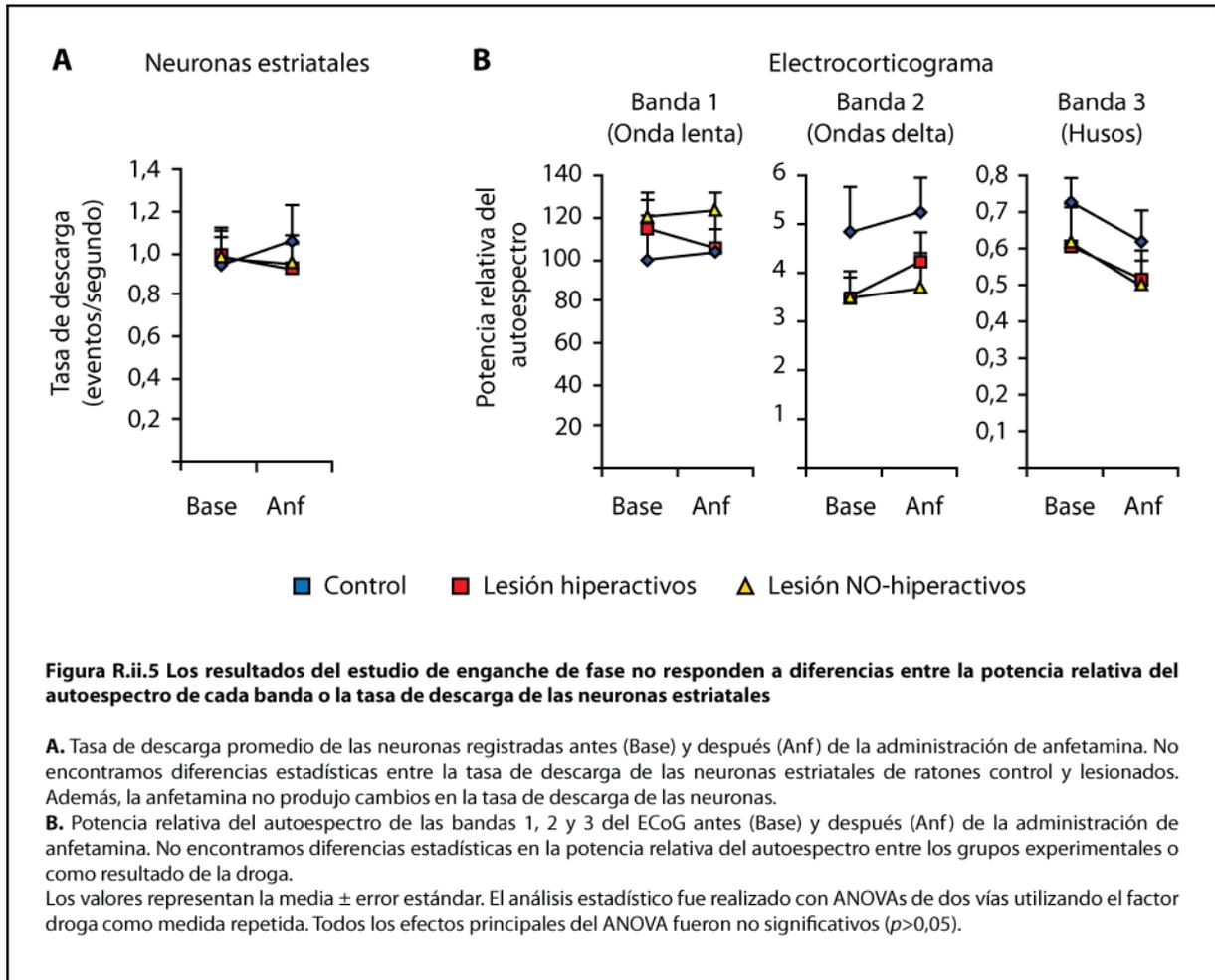
Siguiendo con este razonamiento, nos planteamos que si demostráramos que un tratamiento que revierte la conducta hiperlocomotora es capaz de reforzar el control cortical sobre las descargas estriatales, se reforzaría la idea de que ambos fenotipos están relacionados. Como mencionamos anteriormente (Sección I), la anfetamina tiene un efecto hipolocomotor atípico en roedores con lesión dopaminérgica neonatal (Shaywitz y col. 1976a; Avale y col. 2004a). Además, el tratamiento farmacológico más difundido en pacientes con ADHD son los psicoestimulantes (anfetamina y metilfenidato) cuyo efecto terapéutico actuaría mejorando la regulación córticoestriatal de la atención y la conducta (Volkow y col. 2005; Arnsten 2006). Por ello estudiamos si la anfetamina era capaz de revertir selectivamente el fenotipo electrofisiológico hallado en los animales hiperlocomotores.

El resultado de este experimento reveló que la anfetamina no afecta el enganche de fase córticoestriatal en la *banda* de baja frecuencia que comanda los estados *up* y *down* en ninguno de los grupos experimentales. Sin embargo, el enganche de fase para los ritmos corticales de mayor frecuencia (*bandas 2 y 3*) que se encontraba disminuido en el grupo de ratones hiperlocomotores aumentó significativamente luego de la administración de anfetamina. Este efecto es específico para este grupo, ya que los ratones control y lesionados no-hiperlocomotores mostraron niveles de enganche de fase comparables al registrado durante el período de base pre-anfetamina (**Figura R.ii.4**). Como consecuencia de esto, **bajo los efectos de la anfetamina, los tres grupos animales presentan un perfil de conectividad córticoestriatal similar.**



Es importante destacar que la anfetamina puede tener efectos sobre la actividad de base cortical y la tasa de descarga de las neuronas estriatales (Rebec 2006). Cada neurona estriatal recibe entradas excitatorias provenientes de miles de neuronas corticales (Zheng y Wilson 2002) y es sabido que el disparo de potenciales de acción estriatales sólo ocurre frente a la entrada de estímulos corticales altamente sincronizados (Wilson 1993; O'Donnell y Grace 1995; Charpier y col. 1999) (Kasanetz y col. 2006). Por lo tanto, un aumento de la sincronización cortical debido a un aumento de la conectividad córtico-cortical podría resultar en un aumento de la conectividad córtico-estriatal. De hecho, se ha observado que la transmisión noradrenérgica aumenta la conectividad local en la corteza frontal (Wang y col. 2007), y la anfetamina aumenta la liberación de noradrenalina en la corteza cerebral (Ryan y col. 1985; Geranton y col. 2003) . Estudiamos entonces el efecto de la anfetamina sobre la potencia espectral relativa de las *bandas 1 2 y 3* del electrocorticograma. Dado que las señales analizadas partían de tramos con actividad de onda lenta, encontramos que la potencia de la *banda 1* era comparable entre los tres grupos estudiados antes y después de la administración de anfetamina. Notablemente, encontramos que para los segmentos de señal analizados, la potencia de las bandas de mayor frecuencia también eran comparables entre los tres grupos antes y después de la anfetamina (**Figura R.ii.5**). Entonces, **nuestros resultados probablemente reflejan cambios córticoestriatales más que intracorticales.**

Por otro lado, variaciones en el número de espigas analizadas pueden afectar los resultados del estudio de enganche de fase (Fisher 1993; Siapas y col. 2005). Tanto la lesión neonatal, como la administración de anfetamina podrían haber afectado este parámetro fisiológico. Sin embargo, verificamos que para los segmentos de señal analizados, la anfetamina no produjo cambios significativos en la descarga de las neuronas estriatales (**Figura R.ii.5**), fortaleciendo los resultados obtenidos para el enganche de fase. Notablemente, la tasa de descarga de las neuronas estriatales durante la actividad de base es similar en los tres grupos experimentales (**Figura R.ii.5**) sugiriendo que ni las alteraciones en el enganche de fase ni la hiperlocomoción inducida por la lesión dopaminérgica neonatal podrían deberse a cambios en la frecuencia de disparo de las neuronas estriatales (Luthman y col. 1993)



En esta sección mostramos que los ratones con lesión dopaminérgica neonatal que desarrollan un fenotipo hiperlocomotor presentan una disminución en la sincronización córticoestriatal, evidenciado por un enganche de fase menos estricto para oscilaciones corticales en el rango de 2 a 10 Hz. Esta alteración, parece estar asociada específicamente con la aparición de la hiperlocomoción, ya que los ratones lesionados que no desarrollan este fenotipo presentan los mismos niveles de enganche de fase que los ratones control para el mismo rango de frecuencias corticales. Más aun, la administración de anfetamina en dosis que tienen efecto "anti-hiperlocomotor" actúa sobre la conectividad córticoestriatal aumentando el enganche de fase en el grupo de ratones hiperactivos asemejándola al grupo control. Es interesante notar que este efecto farmacológico es específico de la condición hiperlocomotora, ya que la dosis de anfetamina administrada no produjo cambios en el enganche de fase para ninguna de las frecuencias estudiadas en los ratones control o lesionados NO

hiperactivos. En conjunto, estos resultados apuntan a que las alteraciones de conectividad funcional córticoestriatal pueden ser un endofenotipo de la hiperactividad inducida por la lesión dopaminérgica neonatal.

Es destacable que al intentar correlacionar los resultados conductuales y electrofisiológicos surge que bajo los efectos de la anfetamina los niveles de locomoción no pueden predecirse a partir del enganche de fase córticoestriatal en todos los grupos. Por ejemplo, en los ratones control la anfetamina tiene un efecto hiperlocomotor que no está acompañado de una disminución del enganche de fase córticoestriatal. Podría ser que en animales normales el efecto hiperlocomotor de la anfetamina dependa de acciones en otros circuitos, de hecho, la acción hiperlocomotora de los psicoestimulantes se atribuye comúnmente a la liberación de dopamina en el núcleo accumbens (Wilkinson y col. 1993; Sills y col. 1999). Este resultado plantea la posibilidad de que el efecto agudo conductual y electrofisiológico de la anfetamina ocurra por procesos paralelos diferentes en los animales control y lesionados. Una posibilidad es que, en condiciones normales de inervación del estriado dorsal exista suficiente dopamina endógena como para sostener un elevado enganche de fase corticoestriatal que ocluye la posibilidad de observar un efecto de la anfetamina. La inervación dopaminérgica es menos densa en el Núcleo Accumbens, y de hecho, es sabido que la anfetamina produce efectos relativos mayores en el Núcleo Accumbens que en el estriado dorsal en condiciones normales (Drevets y col. 2001). Entonces, la lesión podría revelar efectos inesperados de la anfetamina sobre la actividad del estriado dorsal y la conducta. Dado que en los animales lesionados la densidad de fibras TH+ remanentes en la zona de registro es muy escasa y existe una hiperinervación serotoninérgica compensatoria, nos inclinamos a pensar que los efectos agudos de la anfetamina pueden involucrar otras monoaminas además de la dopamina.

Una consideración final a tener en presente es que el estado general de vigilia en el que se realizaron los registros electrofisiológicos y la evaluación conductual locomotora son sustancialmente diferentes y que no se puede descartar que existan interacciones entre las condiciones de registro y el estado conductual de los animales. Tampoco podemos descartar la existencia de otros patrones de enganche de fase para ritmos corticales de mayor frecuencia (ritmos beta o gamma) que podrían dar cuenta de

las diferencias observadas entre los grupos experimentales y el tratamiento farmacológico, ya que estos ritmos son difíciles de estudiar en las condiciones experimentales planteadas. Sin embargo, los estados *up* córtico-talámicos que ocurren durante la fase activa de la onda lenta en el sueño natural y bajo anestesia presentan propiedades electrofisiológicas y dinámicas equivalentes al estado de vigilia (Destexhe y col. 2007) y existe una extensa literatura que indica que la conectividad funcional de circuitos en estado de reposo condiciona las respuestas conductuales al entorno y correlaciona con déficit conductuales diversos (Broyd y col. 2009).

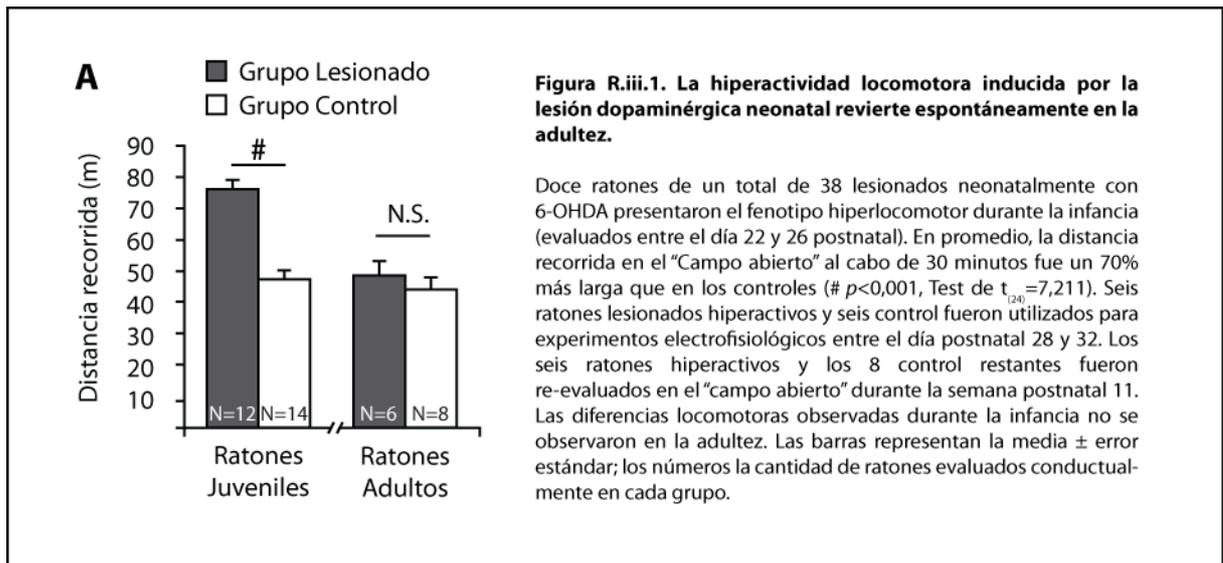
### Sección III

#### *Algunas alteraciones funcionales de los animales que desarrollaron hiperlocomoción en la infancia revierten espontáneamente en el pasaje hacia la adultez, sugiriendo un retraso en la maduración de las funciones reguladas por los circuitos córticoestriatales*

Una característica notable del modelo de lesión dopaminérgica neonatal es que la hiperactividad locomotora observada durante la infancia de los roedores revierte espontáneamente en el pasaje hacia la adultez (Avale y col. 2004a). Notablemente, entre la infancia y la adolescencia ocurren cambios neuroquímicos en los receptores para la dopamina (Introducción) y la lesión dopaminérgica neonatal induce fuertes adaptaciones moleculares en estructuras prosencefálicas que podrían actuar compensatoriamente revirtiendo el fenotipo conductual observado. Nuestra hipótesis es que durante el desarrollo postnatal la dopamina cumple un rol que facilita la maduración funcional del sistema córticoestriatal y de los comportamientos mediados por dichos circuitos y que por lo tanto la lesión dopaminérgica neonatal retrasa este proceso. Para evaluar esta hipótesis estudiamos un grupo de ratones en el campo abierto durante la cuarta semana de vida y seleccionamos un subgrupo de ratones lesionados hiperactivos y control para realizar registros electrofisiológicos durante la infancia (días postnatal 28 a 32). El resto de los animales hiperactivos y control fueron re-evaluados conductualmente después de la adolescencia (semana postnatal 11) y utilizados para electrofisiología en las semanas siguientes (semanas postnatal 12 a 15).

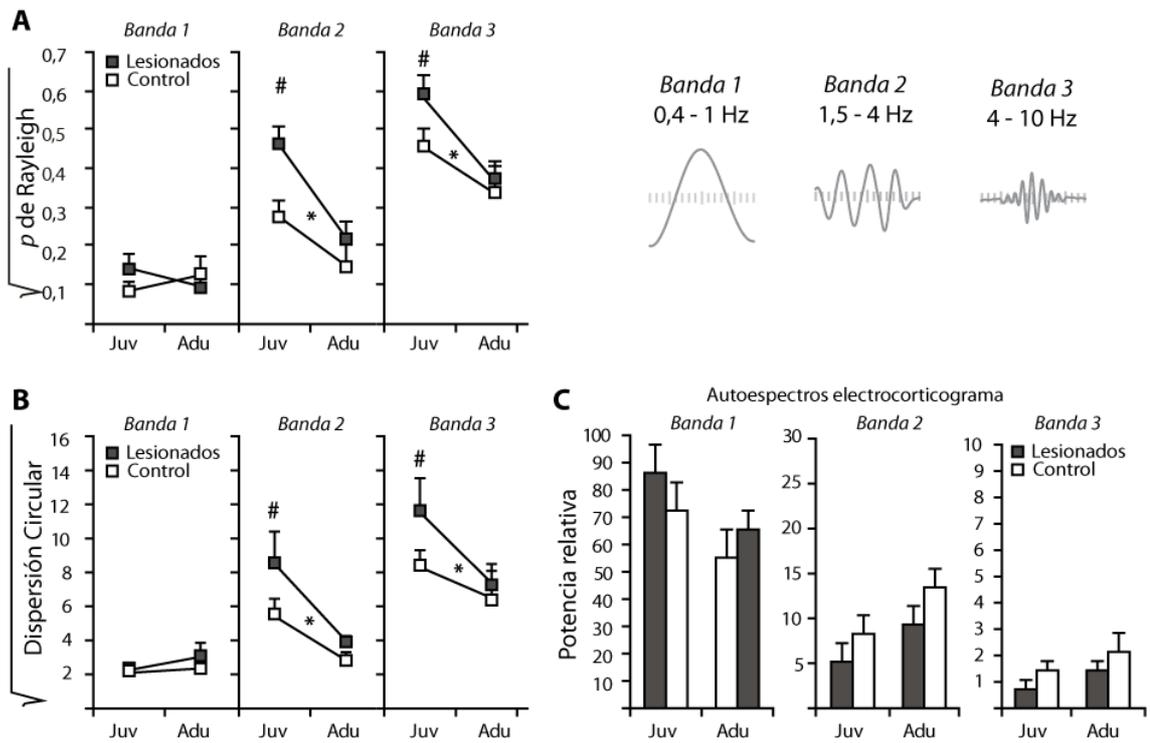
De acuerdo a lo esperado, encontramos que en nuestras condiciones experimentales el fenotipo hiperlocomotor sólo se expresa durante la infancia y que revierte espontáneamente en la adultez (**Figura R.iii.1**, Avale 2004). Siguiendo un razonamiento similar al expuesto en la Sección II, si la hiperactividad inducida por la lesión dopaminérgica neonatal está asociada a un deterioro en el control temporal de la descarga estriatal, sería esperable encontrar que la reversión madurativa del fenotipo hiperlocomotor estuviera acompañada de una reversión del fenotipo electrofisiológico. Por otro lado, ha sido propuesto que las oscilaciones corticales cumplirían un rol en el refinamiento del "cableado"

de los circuitos neurales durante el desarrollo postnatal (Penn y Shatz 1999) y por lo tanto sería razonable pensar que el acople estriatal a los ritmos corticales durante el desarrollo postnatal madure. Sin embargo, no hay en la actualidad reportes que hayan estudiado si la conectividad funcional córticoestriatal presenta cambios madurativos durante el desarrollo postnatal ni tampoco la influencia de las vías dopaminérgicas sobre este proceso.



Para evaluar este objetivo, estudiamos el enganche de fase córticoestriatal para las bandas frecuenciales descritas previamente (Sección II y Métodos). Los hallazgos previos relativos al enganche de fase fueron replicados en un grupo independiente de animales y con una técnica de registro diferente (Métodos): el control cortical sobre la temporalidad de las descargas estriatales aparece deteriorado en los animales juveniles hiperactivos para el rango frecuencial de 2 a 10 Hz (Sección II) mientras que el enganche a ritmos de onda lenta es comparable al de los animales control (**Figura R.iii.2**). Más aún, el enganche de las neuronas estriatales con la *banda I* del electrocorticograma fue similar tanto en los animales juveniles como en los adultos reforzando la idea de que los estados *up* y *down* estriatales ya están "maduros" hacia la cuarta semana de vida (Tepper y col. 1998).

El estudio de ritmos corticales de frecuencias más altas (*bandas 2 y 3*) demostró que tanto en animales lesionados como control el enganche de fase aumenta significativamente en la adultez, sugiriendo que existe **un refinamiento del control cortical sobre las descargas estriatales dependiente del desarrollo**. Más aún, las diferencias entre el grupo lesionado y control pierden significación estadística en la adultez, en paralelo a la reversión del fenotipo conductual en los ratones del grupo hiperactivo (**Figura R.iii.2**). Es importante destacar que el aumento de enganche de fase durante el desarrollo en los animales lesionados no podría ser explicado por aumento en la disponibilidad de dopamina en los animales adultos lesionados ya que la disminución de los niveles de dopamina estriatal en animales lesionados y la disminución de fibras dopaminérgicas en el estriado se mantienen hasta la adultez (ver figura en Métodos; Avale 2004), sugiriendo un rol en este proceso para mecanismos compensatorios. Además, al igual que los resultados de la sección previa, los presentes no pueden ser explicados por cambios en la actividad de campo cortical o del número de espigas utilizadas para el análisis en cada grupo (**Figura R.iii.2**). Por lo tanto, estos resultados sugieren que **el control que ejerce la corteza sobre la temporalidad de la descarga estriatal presenta un retraso madurativo como consecuencia de la lesión dopaminérgica neonatal** y refuerzan la idea de que la hiperactividad inducida por la lesión dopaminérgica neonatal está asociada a una disminución del control cortical sobre las descargas estriatales.



**Figura R.iii.2 El enganche de fase córticoestriatal aumenta durante el desarrollo postnatal independientemente de la integridad de las vías dopaminérgicas.**

**A y B.** Estudio poblacional del enganche de fase en la infancia y adultez en ratones control y ratones lesionados hiperactivos. El enganche de fase de las neuronas estriatales con la actividad de onda lenta cortical (banda 1) no cambia con la maduración y al igual que lo reportado en la sección anterior, no presenta diferencias entre los ratones control y lesionados. Respecto de ritmos corticales de mayor frecuencia (bandas 2 y 3) el enganche de fase aumenta tanto en los ratones control como los lesionados hiperactivos (ver detalles estadísticos al final del pie de la figura). En la adultez, las diferencias estadísticas entre los ratones control y lesionados del enganche de fase para estas bandas desaparece.

Es importante destacar que en estos experimentos llevados a cabo en un grupo independiente de animales y medidos con otro tipo de electrodos (Métodos) replicamos los resultados reportados en la sección anterior según los cuales los ratones lesionados con hiperactividad locomotora presentan un enganche de fase deteriorado durante la infancia. Este deterioro desaparece en la adultez, junto con la pérdida espontánea de hiperlocomoción (Figura R.iii.1).

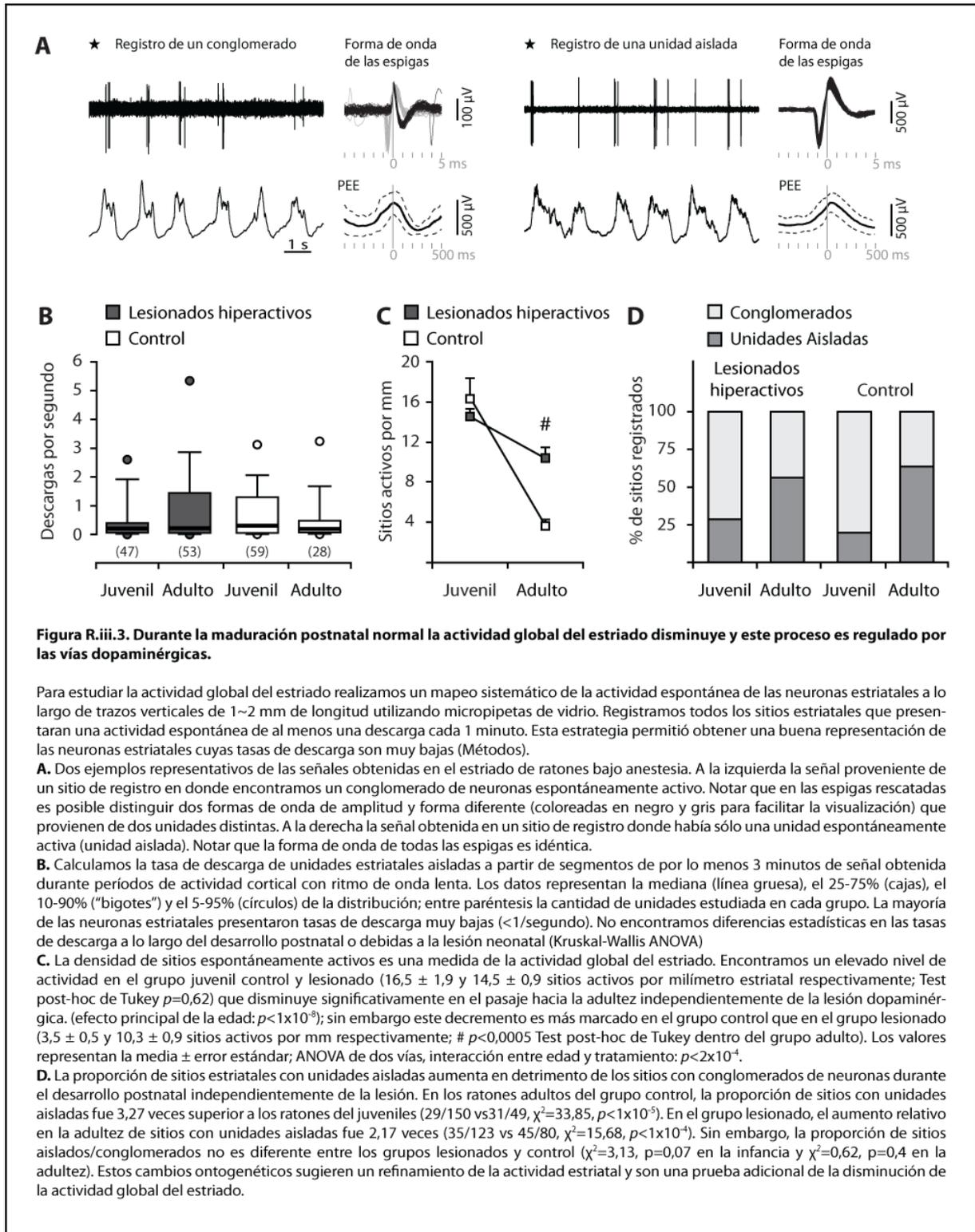
**C.** Potencia relativa del autoespectro de las bandas 1, 2 y 3 utilizadas para el estudio de enganche de fase de los grupos control y lesionado juveniles (Juv) y adultos (Adu). No encontramos diferencias estadísticas entre la potencia de las bandas estudiadas del ECoG entre los distintos grupos experimentales, reforzando la idea de que los cambios en el enganche de fase se deben a cambios córticoestriatales y no cambios corticales.

Los valores representan la media  $\pm$  error estándar. Debido al diseño experimental, realizamos el análisis estadístico con un ANOVA de tres vías independiente para el  $p$  de Rayleigh y la dispersión circular, con un factor de medidas repetidas (bandas) y dos factores independientes (lesión y edad). Obtuvimos efectos principales de la edad ( $p < 0,001$ ) con interacciones significativas entre banda y edad. Por lo tanto computamos el efecto simple de la edad (independizándonos de la lesión) y encontramos que las distribuciones de la banda 2 y 3 eran más concentradas en los animales adultos que en los juveniles (\* $p < 0,01$  Test post-hoc de Tukey). Por otro lado, la interacción significativa entre lesión por banda responde a diferencias significativas entre el grupo lesionado y control durante la infancia para las bandas 2 y 3 (# $p < 0,01$  Test post-hoc de Tukey). El número de neuronas incluidas en este estudio fue 53 y 49 para los ratones juveniles (control y lesionado); 20 y 30 para los ratones adultos (control y lesionado). El número de espigas utilizado para el estudio fue equivalente en los cuatro grupos ( $194,7 \pm 23,1$ )

Los roedores con lesión nigroestriatal neonatal pueden mostrar alteraciones conductuales distintas de la hiperlocomoción que persisten en la adultez como déficit en la inhibición conductual y de aprendizajes instrumentales (Avale y col. 2004a; Nemirovsky y col. 2009). Por otro lado es sabido que la actividad espontánea de neuronas estriatales en roedores aumenta marcadamente durante las primeras tres semanas de vida alcanzando valores relativamente elevados (Napier y col. 1985; Tepper y col. 1998). Es razonable pensar que esta actividad posteriormente decae como resultado de la maduración, ya que una característica conocida de las NEMs adultas es que presentan una tasa de descarga espontánea muy baja (Kasanetz y col. 2002). Sin embargo, prácticamente no existen reportes que hayan estudiado los cambios en la actividad espontánea estriatal de roedores en el pasaje de la infancia a la adultez, y sólo dos reportes de nuestro conocimiento han estudiado los efectos de la denervación dopaminérgica temprana sobre la actividad de las neuronas estriatales y sus resultados son contradictorios (Onn y col. 1990; Luthman y col. 1993). Por ello, investigamos si otros parámetros electrofisiológicos de la actividad estriatal espontánea presentaban cambios como consecuencia de la lesión dopaminérgica neonatal o debido a la maduración postnatal.

En primer lugar, estudiamos los cambios de la actividad de neuronas estriatales individuales computando la tasa de descarga de potenciales de acción. Encontramos que la tasa de descarga estriatal en el grupo control durante la actividad de onda lenta es relativamente baja en ratones juveniles (en promedio menos de 1 descarga por segundo) con niveles de actividad comparables a los ratones adultos (**Figura R.iii.3**). Esto sugiere que **la tasa de descarga de las neuronas estriatales es un parámetro fisiológico que ya se encuentra maduro hacia la cuarta semana de vida**. Consistentemente con los resultados obtenidos en la sección II y lo reportado por Luthman tampoco encontramos cambios en la tasa de descarga estriatal inducidos por la lesión dopaminérgica neonatal en animales juveniles o adultos, reforzando la idea de que **las alteraciones conductuales observadas no serían explicables por cambios en la tasa de disparo de las neuronas estriatales**.

Dado que la mayoría de neuronas estriatales descargan ráfagas de potenciales de acción durante los ciclos de onda lenta y que su tasa de descarga es muy baja, en vez de concentrarnos en neuronas individuales decidimos estudiar si la actividad global del estriado muestra cambios madurativos durante el desarrollo postnatal. Para ello realizamos un mapeo sistemático de la actividad estriatal y computamos la densidad de sitios estriatales espontáneamente activos (Métodos) y encontramos que la cantidad de neuronas activas de los ratones juveniles control es inusualmente elevada y significativamente superior al nivel de actividad de ratones adultos (**Figura R.iii.3**). En la misma dirección de este resultado encontramos que la proporción de sitios con múltiples unidades activas (conglomerados de neuronas) respecto de los sitios con unidades únicas aisladas (Métodos) también es elevada en la infancia y disminuye ostensiblemente en el pasaje hacia la adultez (**Figura R.iii.3**). Ambos resultados muestran que la actividad estriatal espontánea global disminuye sustancialmente durante el desarrollo normal y plantean la posibilidad de que durante el desarrollo postnatal la actividad estriatal sea refinada por procesos madurativos. Al estudiar el efecto de la lesión dopaminérgica neonatal sobre la actividad global estriatal encontramos que de manera similar con lo que ocurre en los animales control, la actividad espontánea estriatal medida como densidad de sitios activos (**Figura R.iii.3**) o proporción de sitios con unidades múltiples (**Figura R.iii.3**) decae a lo largo del desarrollo. De la comparación con el grupo control, surge que la actividad espontánea es semejante entre ambos grupos durante la infancia, pero el decremento ontogenético de la actividad espontánea es menos marcado en los ratones lesionados ya que la densidad de sitios activos se mantiene elevada en la etapa adulta (**Figura R.iii.3**). Este resultado indica que los ratones con lesión dopaminérgica neonatal atraviesan un proceso de maduración de la función córticoestriatal similar a los animales control, pero que este proceso parece ser incompleto.



En esta sección mostramos que durante el pasaje de la infancia hacia la adultez ocurren procesos de maduración funcional del sistema córticoestriatal, evidenciados por un aumento sustancial del enganche de fase córticoestriatal y una disminución significativa de los niveles de actividad espontánea estriatal. Una interpretación posible de estos resultados sería que el conexionado córticoestriatal es difuso y relativamente inespecífico hacia la cuarta semana de vida y que durante el desarrollo postnatal se refina y se hace más selectivo como resultado del aprendizaje y la experiencia (Penn y Shatz 1999). Notablemente estos cambios ontogenéticos no están aparejados con cambios en las tasas de descarga de las neuronas estriatales individuales. Estos resultados están en línea con publicaciones que muestran que los circuitos corticales también atraviesan procesos marcados de maduración durante la adolescencia (Tseng y O'Donnell 2005)

En la Sección II, propusimos que la disminución del acople funcional córticoestriatal podía ser un endofenotipo de la hiperactividad locomotora inducida por la lesión dopaminérgica neonatal. En esta sección reforzamos y extendemos esta propuesta, ya que encontramos que la reversión del fenotipo hiperlocomotor de los ratones lesionados entre la infancia y la adultez correlaciona con un aumento del enganche de fase córticoestriatal en el mismo período; más aún, las diferencias conductuales y de enganche de fase entre el grupo control y lesionado desaparecen en la adultez. Es importante que estos cambios no están asociados a cambios en la tasa de descarga de las neuronas (**Figura R.iii.3**) ni cambios en la actividad cortical (**Figura R.iii.2**).

Contrariamente, alteraciones de otros parámetros electrofisiológicos parecen expresarse sólo en la adultez de los ratones lesionados, como el caso de la densidad de sitios espontáneamente activos. Esta alteración no parece correlacionar de manera directa con el fenotipo conductual estudiado; sin embargo, existen reportes que indican que la lesión dopaminérgica neonatal induce otras modificaciones conductuales que se expresan en la adultez, como la falta de preferencia por los brazos protegidos de un laberinto en cruz (Archer y col. 1988; Avale y col. 2004a) y la capacidad disminuida de adquirir conductas instrumentales (Moy 1995; Nemirovsky y col. 2009) . Estos resultados sugieren que los mecanismos compensatorios luego de la lesión neonatal son insuficientes permitiendo la persistencia de alteraciones funcionales en la adultez. En este sentido es interesante mencionar que

perturbaciones que ocurran en etapas tempranas clave del desarrollo del sistema nervioso central, como el período crítico de los sistemas sensoriales, pueden tener consecuencias que perduran hasta la adultez (Knudsen 2004).

En resumen, los resultados descritos hasta ahora parecen indicar que la lesión dopaminérgica neonatal induce un retraso en la maduración funcional del sistema córticoestriatal y que esto se acompaña de manifestaciones conductuales transitorias como la hiperactividad locomotora. También apoyan la hipótesis de que perturbaciones en etapas tempranas del desarrollo de circuitos neuronales, en este caso circuitos córticoestriatales, pueden tener consecuencias perdurables hasta la adultez. La capacidad compensatoria serotoninérgica (Sección I) o de otros mecanismos parece ser insuficiente para revertir por completo el fenotipo electrofisiológico de los animales lesionados.

## Sección IV

### *Durante el desarrollo postnatal normal existe un proceso fisiológico de depresión córticoestriatal que depende de la integridad del sistema dopaminérgico*

En la sección anterior encontramos que la actividad espontánea estriatal es mucho más elevada en ratones pre-adolescentes que en ratones adultos y que para que esta disminución ontogenética de la actividad estriatal ocurra es necesaria la integridad del sistema dopaminérgico nigroestriatal. Por otro lado, es sabido que las sinapsis córticoestriatales son susceptibles de sufrir depresión a largo término (LTD) y se ha propuesto que la dopamina cumple un rol importante para este proceso (Calabresi y col. 1992). También se piensa que entre la segunda y cuarta semana de desarrollo postnatal existe un proceso de depresión fisiológica córticoestriatal dependiente de dopamina (Tang, K. y col. 2001). Con estos antecedentes, planteamos la hipótesis de que la maduración de los circuitos córticoestriatales se completa durante la infancia y adolescencia como consecuencia del aprendizaje y la experiencia a través de mecanismos de depresión fisiológica de la eficacia sináptica, en donde las sinapsis más usadas se refuerzan y las menos usadas o privilegiadas se deprimen; este proceso sería dependiente de las vías dopaminérgicas nigroestriatales.

Para poder evaluar esta hipótesis el primer objetivo fue obtener un modelo experimental de plasticidad sináptica córticoestriatal *in vivo*. Si bien la literatura en estudios de plasticidad córticoestriatal *in vitro* es extensa y existe la idea de que en general la LTD córticoestriatal es más fácil de inducir que la LTP (Kreitzer y Malenka 2008), los escasos estudios realizados *in vivo* sugieren que el modo predominante de plasticidad córticoestriatal en el animal entero sería la LTP (Charpier y col. 1999; Mahon y col. 2004). En experimentos preliminares *in vivo*, aplicamos un protocolo para inducir plasticidad sináptica consistente en la estimulación tetánica de la región prelímbica de corteza frontal (estimulación eléctrica a alta frecuencia; Calabresi y col. 1992; Lovinger y col. 1993) y estudiamos el cambio en la amplitud de los potenciales de campo estriatales evocados por pulsos "test" aplicados en la misma región cortical (Métodos). En estos experimentos, encontramos que en ratones juveniles

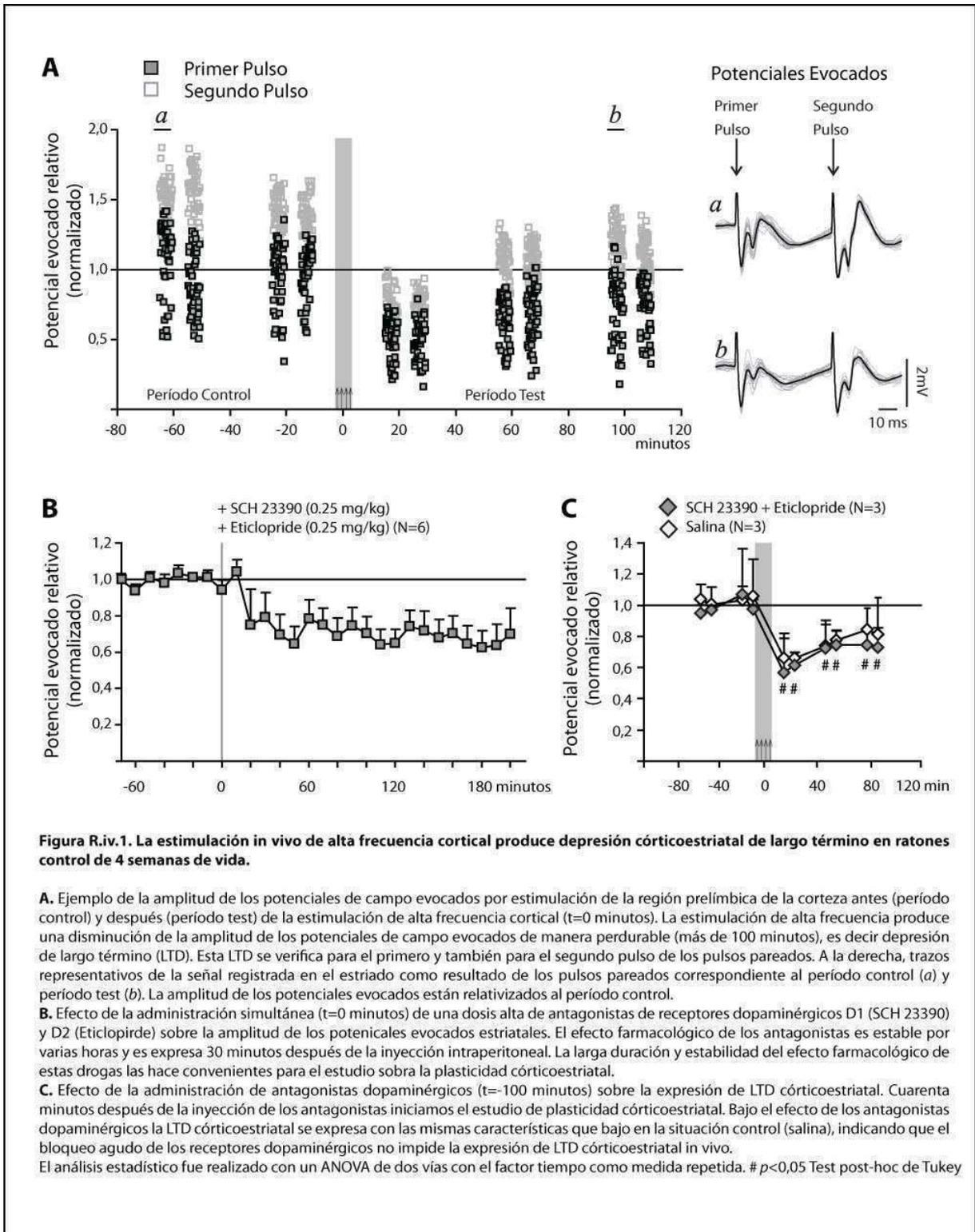
normales el protocolo de estimulación a alta frecuencia es capaz de inducir una disminución de los potenciales estriatales evocados y que esta disminución persiste por más de una hora y media luego de la tetanización (**Figura R.iv.1**). A diferencia de lo que ocurre *in vitro*, este protocolo de tetanización aplicado *in vivo* es capaz de inducir depresión a largo término independientemente de dopamina, ya que el bloqueo de receptores dopaminérgicos tipo D1 y D2 no impide la expresión de LTD (**Figura R.iv.1**). Es importante destacar que este protocolo de inducción de LTD no intenta simular patrones de actividad neuronal que se presentan durante los aprendizajes estriatales, para lo cual sería más razonable -desde una perspectiva experimental- trabajar a nivel celular sobre la temporalidad de los potenciales de acción (por ejemplo, *spike timing dependent plasticity*; Pawlak y Kerr 2008). Por el contrario, es posible que la estimulación de alta frecuencia simule (de una manera exagerada y comprimida en el tiempo) patrones inespecíficos de elevada actividad neuronal que ocurren durante la expansión del conexionado córticoestriatal en la infancia. Un mecanismo como este podría ejercer una influencia más generalizada y homogénea sobre las sinapsis córticoestriatales que la plasticidad asociada al aprendizaje. Por otro lado, estudios recientes realizados en rodajas sugieren que, en condiciones de elevada actividad neuronal, la LTD podría no requerir de dopamina (Adermark y col. 2009), sin que esto implique que protocolos que intentan simular patrones de actividad relacionados con el aprendizaje, como la *spike timing dependent plasticity*, muestren dependencia de la dopamina *in vivo*, tal como ocurre en rodajas.

El siguiente objetivo que nos planteamos fue estudiar los cambios madurativos en la expresión de la LTD córticoestriatal inducida por estimulación a alta frecuencia. Si este tipo de LTD cumple un rol en la maduración córticoestriatal refinando el conexionado, podríamos esperar que resulte más difícil de obtener LTD experimental en animales adultos, cuando el conexionado ya ha sido refinado y la actividad estriatal espontánea es pobre.

Realizamos registros electrofisiológicos aplicando el protocolo de tetanización cortical en ratones anestesiados juveniles (días postnatal 28 a 35) y adultos (semana postnatal 12 a 15) que habían sufrido o no la lesión dopaminérgica neonatal. De acuerdo a nuestra hipótesis, razonamos que la disminución ontogenética de los niveles de actividad estriatal (Sección III) podía ser el resultado de una

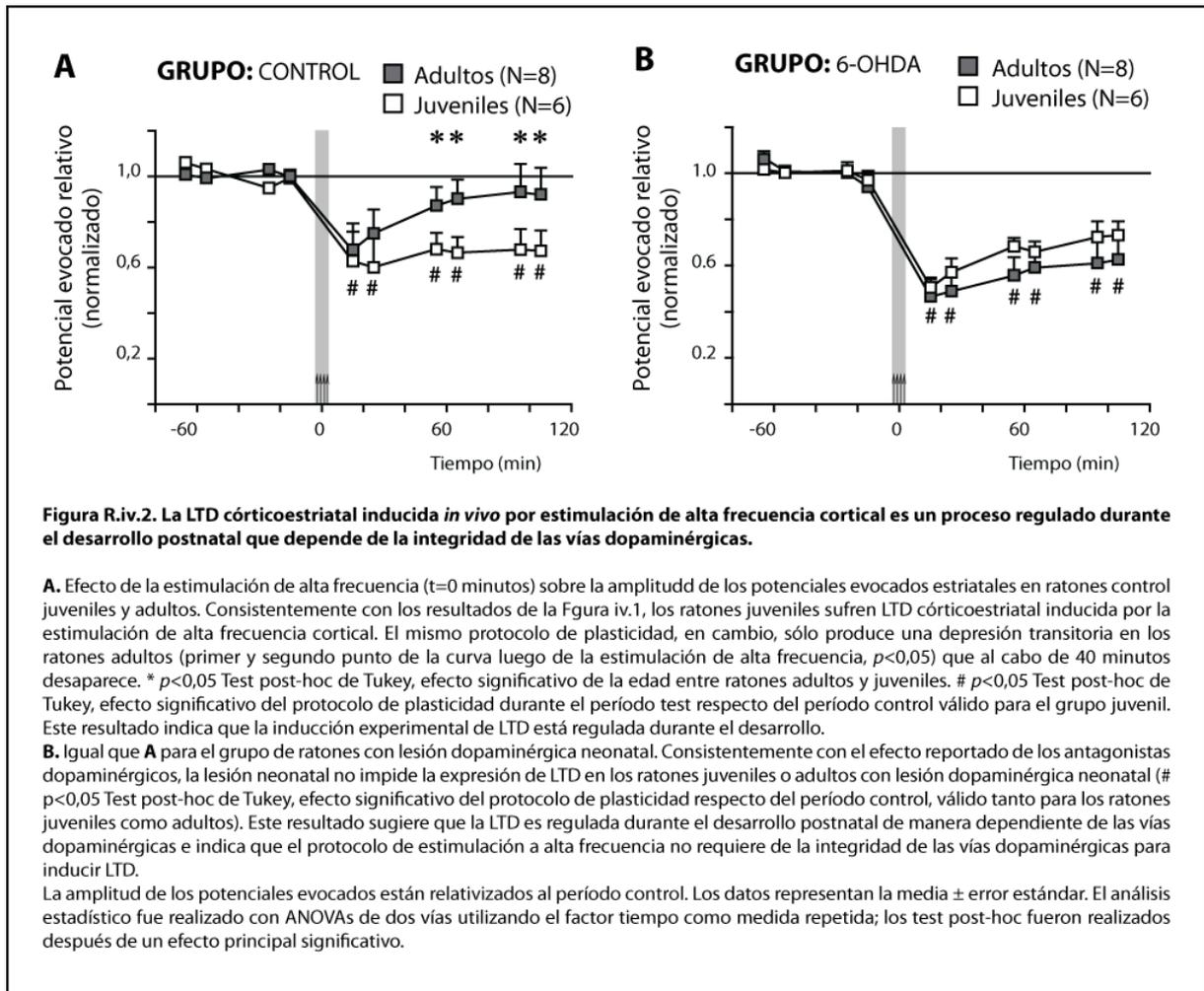
disminución de la fuerza sináptica córticoestriatal mediada por un mecanismo de depresión fisiológica, que tendría un efecto acumulativo durante el desarrollo postnatal. Según este razonamiento, si las sinapsis córticoestriatales han acumulado sucesivos eventos de depresión sináptica, dichas sinapsis se encontrarán cerca de un "piso" de depresión y por lo tanto serán más resistentes a eventos adicionales de depresión. Por el contrario, si las sinapsis se encuentran lejos del piso de depresión, serán más susceptibles de sufrir nuevos eventos de depresión. Razonamientos similares han sido utilizados para estudiar la "saturación" de sinapsis córticoestriatales como consecuencia de aprendizajes motores (Yin y col. 2009) y para determinar la participación de LTP en aprendizajes mediados por el hipocampo con experimentos de "oclusión" (Gruart y col. 2006; Whitlock y col. 2006). Cabe destacar entonces que utilizamos la inducción experimental de LTD como un ensayo que nos permitiera establecer el nivel basal de potenciación/depresión de las sinapsis córticoestriatales, y que por lo tanto contar con un protocolo de plasticidad suficientemente agresivo resulta una ventaja para la evaluación de nuestra hipótesis.

De manera consistente con los resultados preliminares (**Figura R.iv.1**), encontramos que en los ratones juveniles con lesión simulada (grupo control) es posible inducir depresión de los potenciales evocados estriatales. En cambio, el mismo protocolo de tetanización aplicado a los ratones adultos del grupo control es ineficaz para inducir una depresión de larga duración ya que sólo produce una disminución transitoria de la amplitud de los potenciales evocados que revierte rápidamente a valores basales (**Figura R.iv.2**). Este resultado indica que durante el desarrollo postnatal normal el sistema córticoestriatal pierde la capacidad de sufrir LTD y refuerza la idea de que **durante el desarrollo postnatal existe un proceso fisiológico de depresión córticoestriatal**.

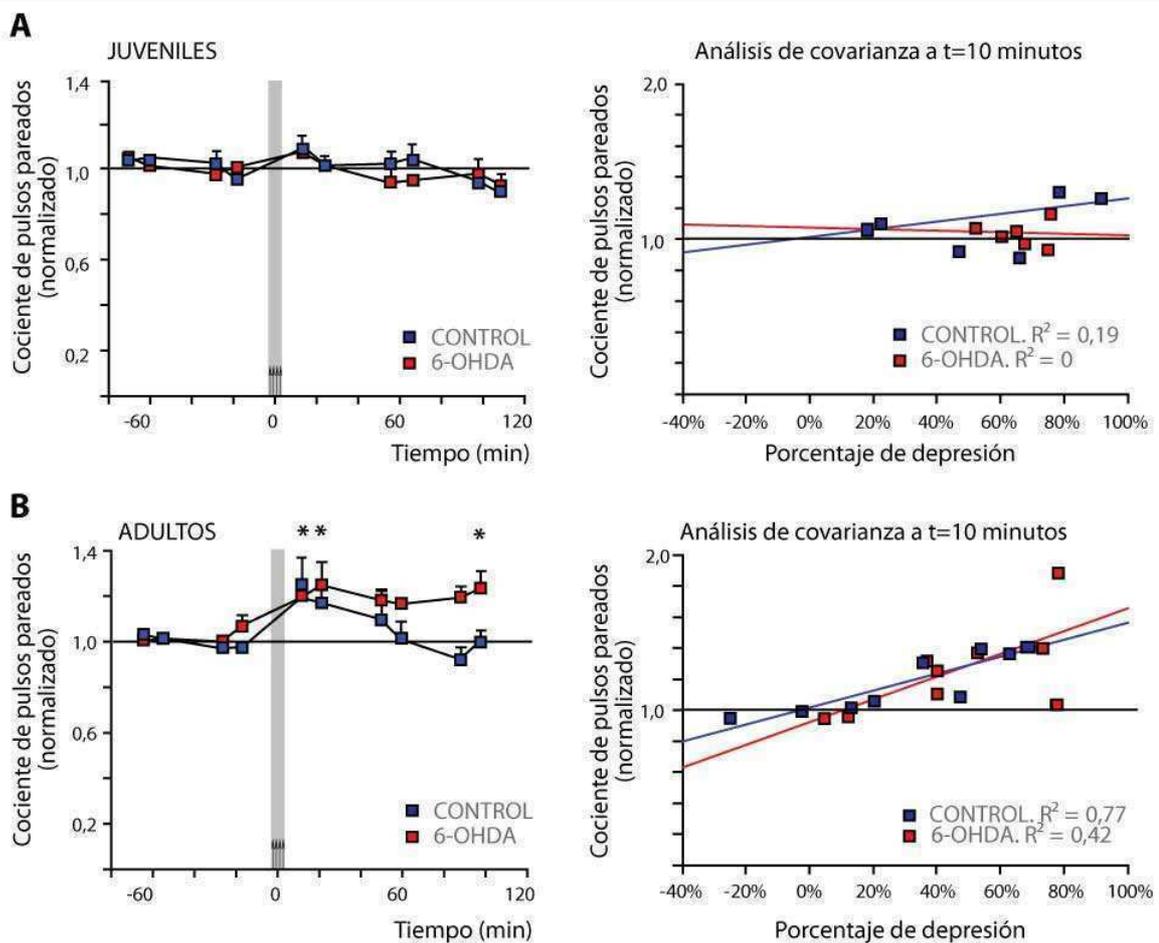


En las secciones anteriores mostramos que la conectividad córticoestriatal madura de manera anormal en ratones con lesión dopaminérgica neonatal. Por ejemplo, la actividad estriatal se mantiene elevada en el adulto (**Figura R.iii.3**). En esta sección mostramos que los antagonistas de receptores para dopamina no bloquean la LTD. Confirmando esta observación, encontramos que *in vivo* la lesión dopaminérgica neonatal no impide la inducción de LTD con el protocolo de tetanización. Más aún, encontramos que tanto la magnitud como la duración de la LTD en ratones juveniles control y lesionados son indistinguibles (**Figura R.iv.2**). Por otro lado, a diferencia de lo que sucede en el grupo adulto de ratones control, el protocolo de tetanización es efectivo para inducir LTD en ratones adultos con lesión dopaminérgica neonatal, sugiriendo que ocurrió una menor acumulación de LTD durante la adolescencia en ausencia de dopamina. La interpretación más simple de este resultado es que la depresión fisiológica de las sinapsis córticoestriatales durante el desarrollo postnatal es mayormente dependiente de la dopamina, y que nuestro protocolo revela la ausencia de dicha depresión fisiológica supliendo el rol endógeno de la dopamina con un exceso de actividad. Nuevamente, estos resultados son consistentes con las hipótesis planteadas y sugieren que los animales adultos que recibieron una lesión dopaminérgica neonatal presentan un perfil de actividad estriatal más “inmaduro” (Sección III).

Por último decidimos estudiar un posible mecanismo involucrado en la depresión córticoestriatal experimental. Es sabido que *in vitro* la expresión de LTD córticoestriatal inducida por estimulación a alta frecuencia se debe a una disminución en la probabilidad de liberación de neurotransmisor presináptico y que el efecto presináptico puede ser estimado a partir de las variaciones en el cociente de pulsos pareados (Choi y Lovinger 1997). De acuerdo a esta teoría, una disminución de la probabilidad de liberación presináptica está asociada a una disminución relativa de la amplitud evocada por el primer pulso del par, mientras que un aumento en la probabilidad de liberación, está asociado a un aumento relativo de la amplitud del primer pulso del par. Estudiamos, entonces, si los cambios plásticos observados *in vivo* estaban asociados a variaciones en el cociente de pulsos pareados.



A diferencia de los resultados reportados *in vitro*, encontramos que la depresión inducida por estimulación de alta frecuencia en ratones control juveniles no está asociada a variaciones en el cociente de pulsos pareados (**Figura iv.3**). Por el contrario, la depresión transitoria observada en los ratones adultos inmediatamente después de la tetanización, covaría con un aumento en el cociente de pulsos pareados. Este resultado sugiere que el mecanismo por el cual la tetanización cortical induce depresión de la respuesta estriatal sería distinto en animales juveniles y adultos y refuerza la noción de que existe un componente madurativo involucrado en los procesos de plasticidad córticoestriatal. Notablemente, en el grupo de animales lesionados se replican los resultados del grupo control, sugiriendo que los mecanismos involucrados en la plasticidad inducida experimentalmente en ambos grupos serían similares.



**Figura R.iv.3. La depresión córticoestriatal inducida *in vivo* por estimulación de alta frecuencia respondería a diferentes mecanismos de expresión dependiente del desarrollo postnatal.**

**A.** Estudio de la variación del cociente de pulsos pareados antes y después de la estimulación de alta frecuencia ( $t = 0$  minutos) cortical en ratones juveniles. Tanto en el grupo lesionado como en el grupo control, la estimulación de alta frecuencia induce depresión córticoestriatal (Figura R.vi.2) que no está acompañada de un aumento en el cociente de pulsos pareados. Un aumento en el cociente de pulsos pareados es interpretado como una disminución de la probabilidad de liberación presináptica de neurotransmisor, indicando un sitio presináptico de expresión. En el caso de los ratones juveniles el cociente de pulsos pareados no varía, sugiriendo que la expresión de este tipo de plasticidad no sería presináptica. A la derecha correlación entre el porcentaje de depresión y variación del cociente de pulsos pareados 10 minutos después de la estimulación de alta frecuencia. Se observa que la variación del cociente de pulsos pareados se mantiene constante independientemente del grado de depresión inducido (porcentaje de depresión;  $N=6$  experimentos por grupo)

**B.** Igual que **A** para los ratones adultos lesionados y control. A diferencia del grupo de ratones juveniles, en los ratones adultos la estimulación de alta frecuencia produce un aumento de la variación del cociente de pulsos pareados transitoria en los animales control (primer y segundo punto de la curva luego de la estimulación de alta frecuencia,  $* p < 0,05$ ) y perdurable en los animales lesionados (último punto de la curva,  $* p < 0,05$ ). El curso temporal de esta variación se corresponde groseramente con el curso temporal de la depresión córticoestriatal en cada grupo. A la derecha se observa que el grado de variación del cociente de pulsos pareados correlaciona con la magnitud de la depresión córticoestriatal inducida ( $p < 0,05$ , ANCOVA). El análisis de covarianza indicó que no hay diferencias significativas entre el grupo control y lesionado, indicando que los cambios madurativos en los mecanismos de plasticidad sináptica ocurren independientemente de las vías dopaminérgicas ( $N=9$  experimentos por grupo)

En esta sección mostramos que *in vivo* es posible inducir experimentalmente LTD córticoestriatal utilizando un protocolo de estimulación eléctrica a alta frecuencia que había sido exitoso para inducir LTD *in vitro* (Lovinger y col. 1993). Este protocolo es suficientemente fuerte como para inducir LTD *in vivo* en presencia de bloqueantes de receptores dopaminérgicos y en ausencia de vías dopaminérgicas nigroestriatales. Este hecho nos permitió utilizar la inducción experimental de LTD como una "sonda" para determinar el grado endógeno de depresión de las sinapsis córticoestriatales (Yin y col. 2009) tanto en ratones control como los lesionados con 6-OHDA.

Los mecanismos celulares de la LTD córticoestriatal inducida por estimulación de alta frecuencia han sido extensamente caracterizados *in vitro* (ver Introducción). Además de un rol importante para la dopamina, se cree que esta forma de plasticidad requiere de la liberación de endocannabinoides por parte de las NEMs (Kreitzer y Malenka 2005; Yin y Lovinger 2006). Los endocannabinoides actúan como mensajeros retrógrados sobre receptores CB1 en las terminales presinápticas y disminuyen la probabilidad de liberación de glutamato por neuronas corticales (Heifets y Castillo 2009). La liberación de endocannabinoides es un fenómeno dependiente de actividad, estaría modulada por la dopamina (Giuffrida y col. 1999; Kreitzer y Malenka 2005) y en las neuronas estriatales puede ser inducida por una despolarización similar a la transición del estado *down* al *up* combinada con la estimulación de receptores glutamatérgicos metabotrópicos postsinápticos. La visión actual en el campo le otorga un papel central a los endocannabinoides en la LTD córticoestriatal y le asigna a la dopamina un rol regulatorio (Kreitzer y Malenka 2005; Yin y Lovinger 2006)

Sin embargo, en nuestros experimentos, la capacidad de la tetanización cortical para inducir LTD experimental no parece estar modulada por la dopamina. Para conciliar este resultado con la literatura, es importante destacar que los experimentos *in vivo* mantienen el conexionado neuronal intacto, mientras que en los experimentos en rodajas la mayor parte del conexionado está interrumpido. Tal vez en las rodajas, la dopamina colabore en aumentar la eficacia de los estímulos de alta frecuencia para producir la liberación de endocannabinoides. Por el contrario, *in vivo* es posible que la potencia de la tetanización sumada a la integridad del conexionado produzcan una estimulación suficientemente fuerte de receptores glutamatérgicos metabotrópicos y conduzcan a un aumento de la producción y

liberación de endocannabinoides por parte de las NEMs sin necesitar del rol facilitatorio de la dopamina (Kreitzer y Malenka 2005; Lovinger 2010)

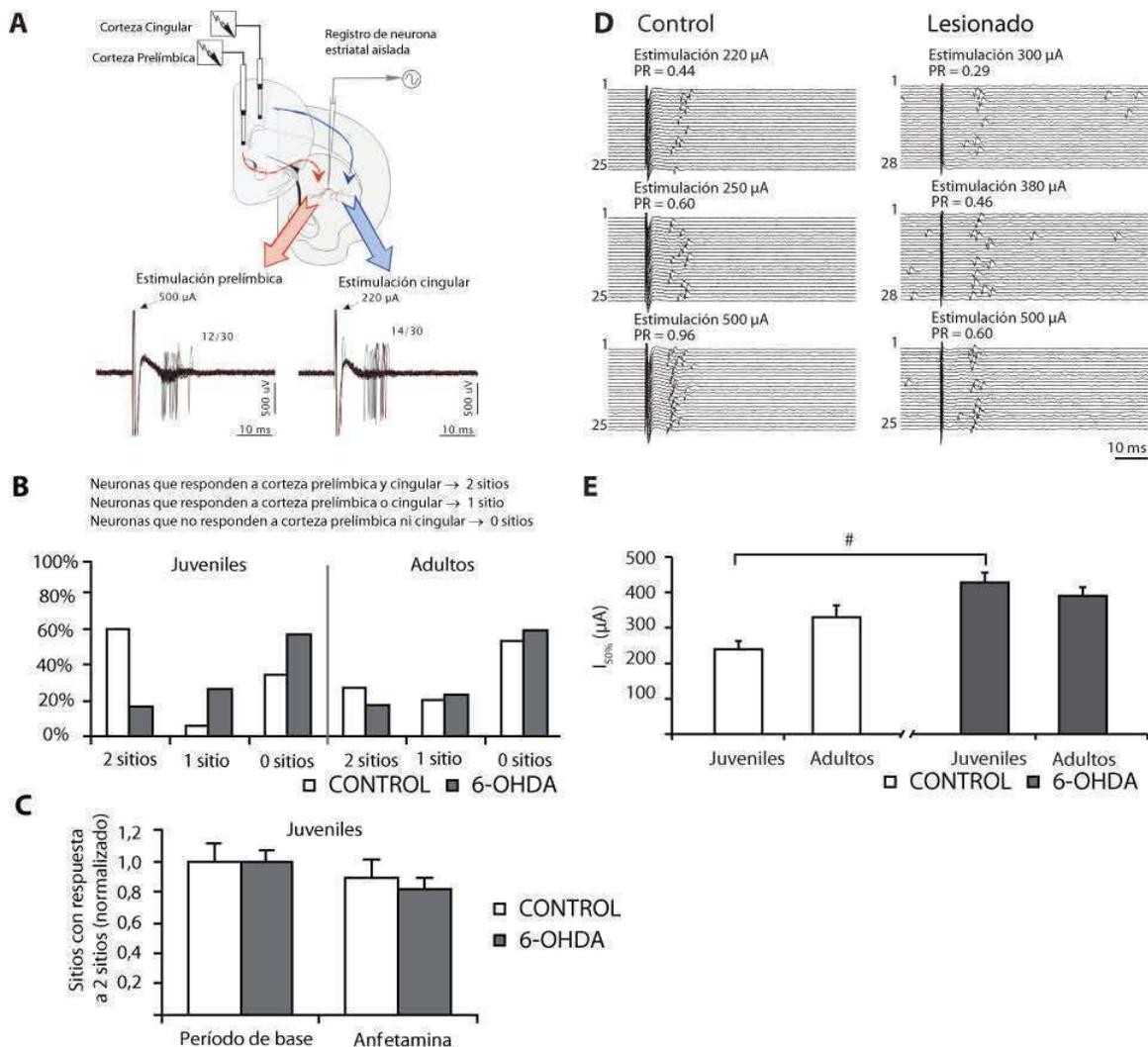
Una consideración que es necesario tener en mente al momento de interpretar los resultados descritos en esta sección es que los potenciales de campo estriatales representan la actividad extracelular de una población de neuronas que puede ser el resultado de la combinación de potenciales postsinápticos inhibitorios y excitatorios. Sin embargo, tanto *in vitro* (Partridge y col. 2000) como *in vivo* en animales anestesiados y animales implantados (Maroun y Richter-Levin 2003; Stoetzner y col. 2010) los potenciales de campo evocados han sido utilizados en experimentos de plasticidad sináptica. Por otro lado, nosotros mostramos que los potenciales evocados estriatales correlacionan con el disparo de potenciales de acción y con los potenciales excitatorios postsinápticos de las NEMs (Cuadro M.3, Métodos).

Al margen de las limitaciones técnicas, en esta sección encontramos que la inducción experimental de LTD *in vivo* depende del desarrollo postnatal normal: en animales jóvenes es más fácil de inducir que en animales adultos sugiriendo que durante el desarrollo normal las sinapsis córticoestriatales se van deprimiendo quizás como resultado de la maduración y de los aprendizajes de las conductas dependientes de los GB. También encontramos que el pasaje por la adolescencia no ocluye la capacidad para inducir LTD por estimulación a alta frecuencia en los animales con lesión dopaminérgica neonatal. Este hecho sugiere que la depresión fisiológica córticoestriatal, que probablemente es inducida por patrones más sutiles de correlación entre la actividad pre y postsináptica córticoestriatal, depende en alguna medida de la dopamina. Notablemente, estos cambios ocurren en paralelo con la evolución ontogenética del nivel de actividad espontánea estriatal según las hipótesis planteadas, reforzando la idea de que la dopamina nigroestriatal promueve una disminución de la actividad estriatal durante la adolescencia a través de un predominio de la LTD como mecanismo de plasticidad.

## Sección V

*La integridad del sistema dopaminérgico durante el desarrollo postnatal es necesaria para que el estriado integre adecuadamente estímulos originados en distintas regiones corticales.*

En las secciones anteriores mostramos evidencia que sugiere que el conexionado funcional córticoestriatal de ratones es relativamente inmaduro en la infancia, que adquiere características adultas pasada la adolescencia y que la maduración funcional de este conexionado depende de las vías dopaminérgicas. En animales adultos, es sabido que los GB presentan un elevado grado de segregación en canales anátomo-funcionales. Estos canales darían lugar al procesamiento en paralelo de la información cortical sustentando distintos aspectos motores y no-motores del comportamiento (Alexander y col. 1986; Middleton y Strick 2000). Este marco conceptual ha sido útil entre otras cosas para comprender las alteraciones asociadas a patologías de los GB (Middleton y Strick 2000). Sin embargo, este modelo estático resulta reduccionista y actualmente se cree que la interacción entre canales paralelos es indispensable para procesos de aprendizaje y adaptación de la conducta de acuerdo a la experiencia pasada (Haber 2003; Voorn y col. 2004) . Nos propusimos, entonces, investigar si las capacidades del estriado para la integración-segregación de información cortical maduran durante el desarrollo postnatal. Además, ha sido propuesto que durante las primeras semanas de vida el establecimiento de las conexiones córticoestriatales podría ser "organizado" por la dopamina (Tang, K. y col. 2001). Para la realización de este objetivo, llevamos a cabo experimentos de estimulación cortical en dos regiones cercanas/contiguas de la corteza frontal (región Prelímbica y Cingular) y estudiamos las respuestas evocadas en el estriado (**Figura R.v.1**). Los grupos experimentales utilizados fueron ratones juveniles y adultos con lesión dopaminérgica neonatal y controles.



**Figura R.v.1. Durante el desarrollo postnatal la respuesta de neuronas estriales a la estimulación cortical se hace más selectiva. La lesión dopaminérgica neonatal disminuye la respuesta de las neuronas estriales.**

**A.** Esquematización de la estrategia para estudiar la respuesta a la estimulación cortical. Luego de aislar una neurona estriatal aplicamos series de 20 a 30 pulsos en la región prefrontal y cingular a fin de determinar si la neurona registrada respondía a estímulos focales de esa región de la corteza frontal. En los casos en que la estabilidad del registro lo permitió, estudiamos distintas intensidades (entre 100 y 500  $\mu$ A) sobre ambas cortezas. La señal corresponde a un ejemplo de una neurona que respondió a los estímulos aplicados en ambos sitios corticales. Otras neuronas registradas no respondieron a alguna o ninguna de las regiones corticales estimuladas.

**B.** Resultados poblacionales de neuronas que responden a la estimulación de 1, 2 ó ninguno de los sitios evaluados. Los ratones juveniles control presentan una gran proporción de neuronas que responden a ambos sitios de estimulación mientras que los ratones adultos presentan muy pocas neuronas que respondan a uno o a los dos sitios estimulados ( $p < 0,04$  Test de Chi cuadrado). Este resultado sugiere que durante la infancia la convergencia funcional de territorios corticales sobre neuronas estriales es alta y que disminuye durante el desarrollo, aumentando la segregación. Los ratones con lesión dopaminérgica neonatal presentan una baja probabilidad de respuesta convergente en la infancia y en la adultez comparado con el grupo control juvenil ( $p < 0,0003$  Test de Chi cuadrado), sugiriendo que el conexonado funcional córticoestriatal es más acotado.

**C.** La administración de amfetamina en forma aguda (4 mg/kg i.p.) no modifica la proporción de sitios estriales que responden a la estimulación de 2 sitios corticales en ratones juveniles.

**D.** Ejemplo de neuronas registradas en ratones juveniles del grupo control y lesionado en la que fue posible determinar la Intensidad 50 de respuesta ( $I_{50\%}$ , ver Métodos). La neurona del ratón control presenta una  $I_{50\%}$  baja (220  $\mu$ A) mientras que la de la neurona del ratón lesionado es más alta (380  $\mu$ A).

**E.** Resultado poblacional del estudio de  $I_{50\%}$  que muestra que los ratones control juveniles necesitan intensidades menores de estimulación para provocar respuesta neuronal en el estriado, mientras que los ratones adultos requieren de una mayor intensidad de estimulación, indicando una menor capacidad de respuesta o excitabilidad extrínseca. La lesión dopaminérgica neonatal provoca un deterioro en la capacidad de respuesta de las neuronas estriales durante la etapa infancia. #  $p < 0,02$  Test pos-hoc de Tukey luego de una interacción significativa en un ANOVA de dos vías ( $p < 0,001$ ).

En primera instancia, estudiamos la excitabilidad córticoestriatal extrínseca de las neuronas estriatales (Métodos, **Figura R.v.1**). Encontramos que la intensidad de los estímulos corticales necesarios para evocar respuestas en ratones juveniles del grupo control es menor que la de los ratones adultos, sugiriendo que **la excitabilidad de las neuronas estriatales es elevada durante la infancia y disminuye durante el desarrollo postnatal**. Notablemente, la excitabilidad de las neuronas estriatales tanto de los ratones lesionados juveniles como adultos es menor que los ratones juveniles del grupo control y comparable a la de los ratones adultos (**Figura R.v.1**), sugiriendo que **la lesión dopaminérgica disminuye la capacidad de las neuronas estriatales de responder a estímulos corticales en los ratones juveniles**. Teniendo en cuenta que la latencia de las respuestas es consistente con una respuesta monosináptica y con los resultados previos de la literatura, estos resultados demuestran que las conexiones córticoestriatales son funcionalmente más activas durante la infancia cuando las vías dopaminérgicas están intactas.

A continuación estudiamos el grado de segregación/convergencia de las vías córticoestriatales analizando la proporción de neuronas estriatales que respondieron a la estimulación de los dos sitios corticales, un solo sitio, o ningún sitio. Un grado de segregación anatómico o funcional elevado debería verse reflejado en una proporción relativamente alta de neuronas que responden a comandos provenientes de una región cortical acotada; por el contrario un grado de segregación bajo debería estar acompañado por una proporción relativamente mayor de neuronas que responden a la estimulación de más de una región cortical.

Este experimento, mostró que en los animales juveniles control la mayoría de las neuronas estriatales responden a los comandos corticales aplicados tanto en la región cingular como prelímbica de la corteza frontal (**Figura R.v.1**). Contrariamente, en los animales adultos del grupo control la mayor parte de las neuronas no responde a ninguno de los dos sitios corticales estudiados. Este resultado sugiere que en etapas tempranas del desarrollo **el conexionado córticoestriatal es funcionalmente más difuso y durante la maduración postnatal la selectividad de las neuronas estriatales aumenta**. Además, refuerza los resultados de la Sección III (**Figura R.iii.2**) sugiriendo que durante el

desarrollo postnatal existe un refinamiento del conexionado córticoestriatal tanto en el dominio espacial como en el dominio temporal (Sección III).

A diferencia de lo que ocurre en los ratones control, la mayor parte de las neuronas de los ratones juveniles con lesión dopaminérgica neonatal no responde a ninguna de las regiones corticales estimuladas y pocas neuronas responden a los dos sitios corticales estimulados. Llamativamente, este patrón de baja probabilidad de respuesta a estímulos corticales no progresa durante el desarrollo de los animales lesionados (**Figura R.v.1**) indicando que este aspecto de la funcionalidad del sistema córticoestriatal no madura en ausencia de las vías dopaminérgicas. Más aún, el patrón de respuesta de los ratones del grupo lesionado es indistinguible del patrón observado en los ratones adultos del grupo control (**Figura R.v.1**). Este resultado indica que **la destrucción de las neuronas dopaminérgicas está asociada a un patrón de mayor segregación funcional de las vías córticoestriatales a lo largo de las etapas del desarrollo postnatal estudiadas** y permite pensar que la ausencia de vías dopaminérgicas "contrae" funcionalmente los dominios córticoestriatales.

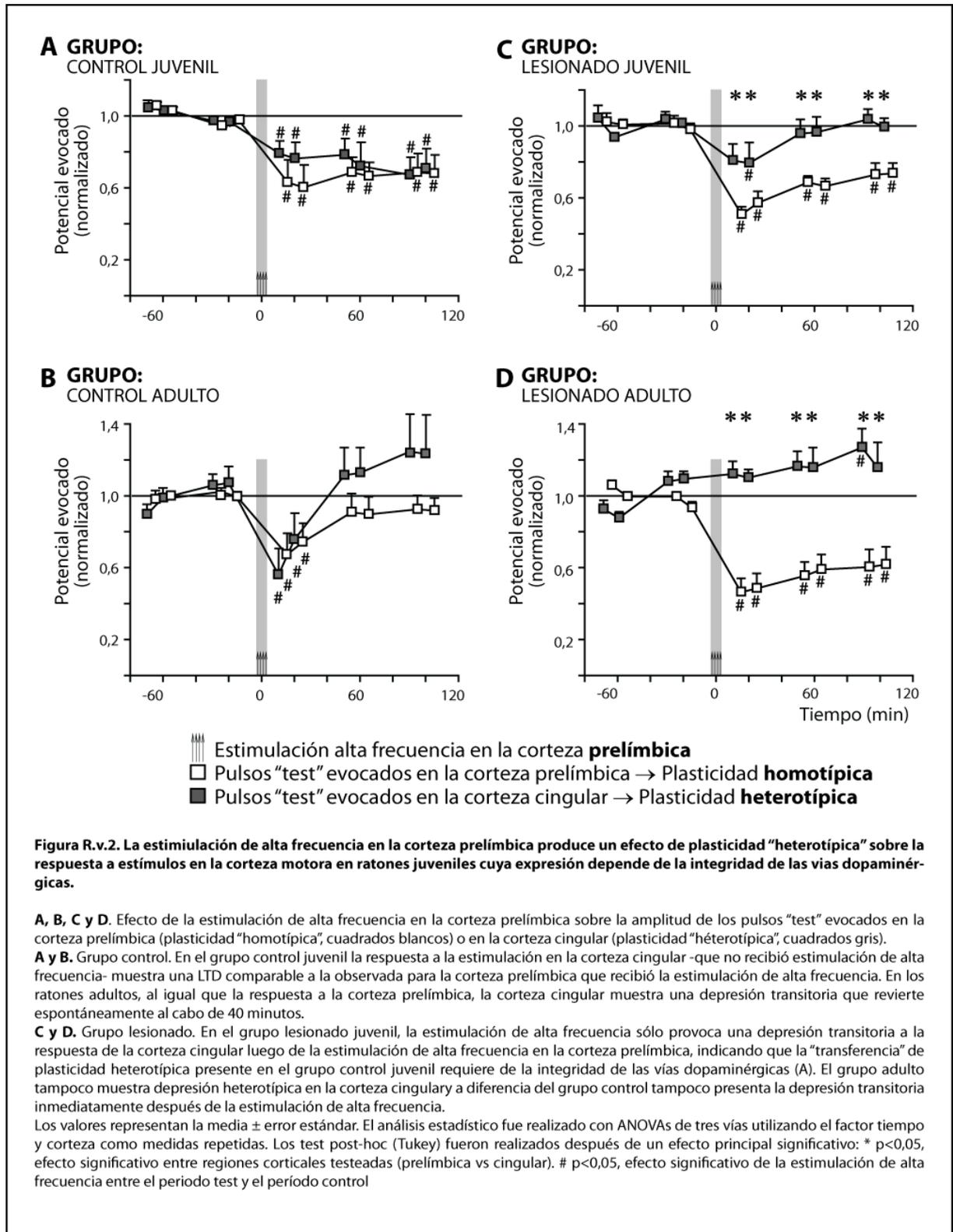
Por último decidimos estudiar si las alteraciones observadas a nivel de células aisladas impacta de manera global sobre las interacciones entre los circuitos córticoestriatales. Como mencionamos anteriormente, los GB conforman circuitos paralelos que contribuyen con la adquisición, selección y ejecución de distintos tipos de conductas. Es sabido también que muchas de estas conductas son adquiridas a través de la experiencia y se cree que el aprendizaje de las mismas es dependiente de la interacción entre los circuitos paralelos (Haber 2003; Yin y col. 2008) (Balleine y col. 2009; Dias-Ferreira y col. 2009) . Más aún, un rol importante tanto en el aprendizaje como en la comunicación entre canales paralelos ha sido propuesto para las vías dopaminérgicas mesoestriatales (Haber y col. 2000; Ikemoto 2007; Belin y Everitt 2008). Si este fuera el caso, esperaríamos encontrar alteraciones en la comunicación entre canales córticoestriatales en los ratones con lesión dopaminérgica neonatal.

Para evaluar esta hipótesis decidimos utilizar el paradigma de plasticidad sináptica *in vivo* descrito en la Sección IV. Es sabido que en determinadas condiciones la inducción de plasticidad sináptica experimental puede provocar plasticidad "heterosináptica" sobre otras sinapsis que no habían estado

involucradas durante el proceso de inducción (Calabresi y col. 1992; Chevaleyre y col. 2007; Singla y col. 2007). Extrapolando esta idea al estudio de los canales córticoestriales, razonamos que la tetanización de la corteza prelámbica (Sección IV) podría tener un efecto "homotípico" sobre los potenciales evocados por pulsos "test" aplicados en la misma región cortical (prelámbica) y un efecto "heterotípico" sobre los potenciales evocados por pulsos "test" aplicados en la corteza cingular (Métodos, Cuadro M.3).

En los ratones juveniles del grupo control encontramos que la tetanización de la corteza prelámbica induce una depresión de los potenciales evocados por estimulación de la corteza cingular. Notablemente, esta depresión "heterotípica" o "cruzada" es comparable tanto en magnitud como duración con la depresión "homotípica" o "directa" inducida en los mismos animales (**Figura R.v.2**). Por otro lado, en los ratones adultos, en los que la tetanización de la corteza prelámbica sólo induce una depresión "homotípica" transitoria, encontramos que no hay expresión de LTD "heterotípica" (**Figura R.v.2**). Estos resultados sugieren que en animales control juveniles **los cambios plásticos inducidos por estimulación de alta frecuencia en una región focal de la corteza frontal se transfieren "espontáneamente" a otros circuitos córticoestriales que no habían recibido estímulos tetánicos.**

Por último, estudiamos los efectos de la lesión dopaminérgica neonatal sobre la expresión de la plasticidad "heterotípica". En la sección anterior habíamos mostrado que los animales control y lesionados juveniles presentaban niveles comparables de LTD "homotípica" (**Figura R.iv.3**) y que las diferencias entre los grupos experimentales se hacían evidentes en la adultez. Sin embargo al estudiar la plasticidad "heterotípica" en ratones lesionados, encontramos que tanto los ratones juveniles como los adultos la tetanización de la corteza prelámbica no induce depresión "heterotípica" sobre el canal córticoestriatal cingular (**Figura R.v.2**). Este resultado indica que **la lesión dopaminérgica neonatal interfiere con la transferencia "espontánea" de cambios plásticos entre los canales córticoestriales estudiados.**



En esta sección mostramos que la excitabilidad extrínseca de las neuronas estriatales sufre cambios madurativos importantes durante el pasaje de la infancia a la adultez y que en consonancia con los resultados reportados en secciones previas, este proceso madurativo está modulado o depende de las vías dopaminérgicas. También encontramos que en los ratones juveniles la mayor parte de las neuronas estriatales son capaces de responder a estímulos originados en dos regiones corticales cercanas pero diferentes y que esta capacidad disminuye en el pasaje de la infancia hacia la adultez. Entonces, esto parece indicar que la segregación topográfica córticoestriatal en canales anatómo-funcionales paralelos es menos marcada en los animales juveniles y más prominente en los animales adultos. Por otro lado, mostramos que los ratones con lesión dopaminérgica neonatal presentan un perfil de conectividad relativamente restringido y comparable al de los ratones control adultos. Este resultado sugiere que las vías dopaminérgicas durante la infancia podrían "expandir" funcionalmente el conexionado córticoestriatal aumentando la capacidad de las neuronas estriatales de procesar información proveniente de sitios anatómicamente menos conectados. En este sentido, la lesión dopaminérgica pone al descubierto un patrón corticoestriatal de segregación más marcado con menor capacidad de integración.

Es interesante recordar que durante la primera semana de vida postnatal la arborización de axones corticales en el estriado ocurre primero en los sitios de más densa inervación dopaminérgica (Nisenbaum y col. 1998). Este hecho refleja una fuerte relación entre ambos fenómenos y permite plantear la posibilidad de que la "expansión" funcional de los dominios córticoestriatales dependiente de las vías dopaminérgicas sea el resultado de un cambio estructural en el cual las vías dopaminérgicas promoverían el establecimiento de una mayor cantidad de conexiones sinápticas córticoestriatales (Tepper y col. 1998). También es sabido que el número de sinapsis corticales es elevado en etapas tempranas del desarrollo y que entre la infancia y la adolescencia ocurre un proceso de podado sináptico muy importante (Johnston 2004). En tal sentido, la disminución madurativa de los dominios córticoestriatales podría ser explicada por un podado de las sinapsis córticoestriatales menos favorecidas como resultado de la experiencia y el aprendizaje. En la lesión dopaminérgica neonatal, por el contrario, la ausencia de vías dopaminérgicas impediría la expansión de los dominios

córticoestriatales durante la infancia, estableciéndose un conexionado córticoestriatal más estereotipado y menos propenso al cambio madurativo.

Las capacidades de integración de información cortical a nivel de célula única, que parece estar facilitada por las vías dopaminérgicas, podrían estar involucradas en el establecimiento de aprendizajes asociativos. En este mismo sentido, se cree que la depresión córticoestriatal mediada por endocannabinoides también cumpliría un rol en los aprendizajes asociativos dadas las propiedades de especificidad sináptica que caracterizan a este tipo de plasticidad (Singla y col. 2007). *In vivo*, el protocolo de plasticidad sináptica estudiado, sugiere que los canales córticoestriatales pueden conectarse funcionalmente, ya que la inducción de depresión a largo término en el canal “prelímico” se transfiere espontáneamente hacia otro canal (“cingular”) sin que éste haya recibido estimulación tetánica. Este resultado permite pensar que durante la adquisición de nuevas conductas la actividad en un canal córticoestriatal es capaz de influir sobre la actividad de otro canal (Haber y col. 2006; Yin y Knowlton 2006). Más aun, la comunicación funcional entre los canales queda interrumpida por la lesión dopaminérgica neonatal ya que desaparece la transferencia de LTD espontánea entre canales, poniendo de manifiesto la importancia de las vías dopaminérgicas en este proceso (Haber 2003). Sugestivamente, cabe recordar que la adquisición de conductas instrumentales, que se sustentan en procesos de aprendizaje asociativos, está deteriorada en ratones con lesión dopaminérgica neonatal (Nemirovsky y col. 2009) y que las vías dopaminérgicas mesoestriatales serían necesarias para la transformación de conductas instrumentales adquiridas inicialmente dirigidas a alcanzar metas (dependientes del estriado ventromedial) en conductas instrumentales habituales (dependientes del estriado dorsolateral; (Belin y Everitt 2008).

En conjunto con los resultados de las secciones previas, los resultados de estimulación refuerzan la noción de que el conexionado córticoestriatal es funcionalmente activo hacia la cuarta semana de vida pero que sin embargo muchas propiedades de los circuitos córticoestriatales presentan características inmaduras que evolucionan en el pasaje de la infancia hacia la adultez. Más aún, los experimentos con los ratones lesionados evidencian fuertemente la importancia de las vías dopaminérgicas nigroestriatales en la función normal de estos circuitos tanto en etapas tempranas como tardías del

desarrollo postnatal y soportan la idea de que alteraciones tempranas del sistema nervioso central pueden tener consecuencias que perduran hasta la adultez a pesar del desencadenamiento de mecanismos compensatorios.

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta tesis son compatibles con la hipótesis general de trabajo que supone que el sistema córticoestriatal es inmaduro al momento del nacimiento y completa su maduración pasada la adolescencia. Comparados con ratones preadolescentes, en los ratones adultos la densidad de sitios estriatales espontáneamente activos se reduce a la cuarta parte, el enganche de fase con ritmos corticales de entre 2 y 10 Hz aumenta significativamente, la probabilidad de las neuronas estriatales de responder a estímulos eléctricos en la corteza frontal disminuye y la estimulación de alta frecuencia en la región prelímbica de la corteza falla en la inducción de depresión a largo término. La maduración de estos procesos parece ser facilitada por las vías dopaminérgicas en algunos casos (densidad de sitios activos y resistencia a la LTD) y no en otros (enganche de fase), sugiriendo que perturbaciones de la neurotransmisión dopaminérgica que ocurran en etapas clave del desarrollo pueden tener efectos perdurables sobre algunas funciones de los circuitos córticoestriatales mientras que otras pueden madurar gracias mecanismos compensatorios.

### **1. Refinamiento de los circuitos córticoestriatales durante el desarrollo**

Los circuitos córticoestriatales sufren un proceso de refinamiento durante el desarrollo postnatal normal. Este proceso comenzaría en un estado de alta conectividad córticoestriatal en la infancia caracterizado por dominios córticoestriatales difusos y altamente superpuestos, una elevada actividad espontánea estriatal dirigida por entradas corticales y un nivel endógeno de depresión sináptica muy bajo (es decir, un estado basal de alta potenciación). Durante la adolescencia, como resultado de la experiencia y facilitado por las vías dopaminérgicas, especulamos que los territorios córticoestriatales se irían reduciendo gracias a un proceso de LTD.

La lesión neonatal de las vías dopaminérgicas revela en los ratones juveniles un patrón de conectividad córticoestriatal espacial más acotado y estereotipado. Este resultado permite especular que durante la formación de los circuitos, la conectividad córticoestriatal sería expandida por las vías dopaminérgicas

durante una fase crítica del desarrollo, la infancia, caracterizada por una mayor capacidad plástica del sistema.

Durante la infancia, el establecimiento de un mayor número de conexiones corticales sobre cada NEM podría tener un efecto sobre el poder de "asociatividad" del estriado. La mayor asociatividad del estriado podría impactar fuertemente sobre su capacidad computacional y el establecimiento de un mayor repertorio de patrones conductuales. Este repertorio sería adquirido a partir de la creciente exposición a nuevas experiencias durante la infancia tardía y adolescencia, y determinaría el "estado final" del sistema, caracterizado por una retracción neta de conexiones córticoestriatales funcionales, que podría ser el resultado del podado y estabilización sináptico mediado por mecanismos de plasticidad sináptica dependientes de dopamina como la LTD fisiológica del desarrollo. En este contexto, cabe preguntarse si la pobreza de posibilidades que ofrece el ambiente en el que se desarrollan los animales de laboratorio no favoreció nuestras chances de observar una retracción funcional de la conectividad córticoestriatal. Resulta atractivo especular qué sucedería con las propiedades fisiológicas del sistema córticoestriatal de animales criados en ambientes enriquecidos o por el contrario, en ambientes reducidos, ya que se sabe que la complejidad de las espinas dendríticas de las NEMs aumenta en respuesta a una crianza en un ambiente enriquecido durante la infancia y cuál sería su interacción con la disponibilidad dopaminérgica durante el desarrollo.

En este tren de ideas, es posible pensar que la lesión dopaminérgica neonatal acotaría las capacidades computacionales de los ganglios de la base, impactando sobre la flexibilidad conductual de los animales.

Es interesante recordar que se cree que la dopamina tendría un efecto morfogénico sobre las NEMs aumentando la formación de procesos (Schmidt y col. 1996) y que el establecimiento de conexiones córticoestriatales podría estar regulado por las vías dopaminérgicas (Voorn y col. 1988). Además, ha sido descrito que el circuito córticoestriatal en roedores presenta una expansión de distintos aspectos anatómicos y neuroquímicos entre la tercera y sexta semana de vida para mostrar una retracción en semanas posteriores (Butler y col. 1998). Por otro lado, también fue descrito que durante la segunda

semana de vida la forma de plasticidad sináptica córticoestriatal más prominente es la LTP que luego desaparece para dar lugar a la expresión de LTD (Partridge y col. 2000). Estas evidencias son consistentes con nuestros resultados funcionales y en conjunto sugieren que las vías dopaminérgicas cumplirían un rol doble en distintas fases del desarrollo postnatal, promoviendo primero la expansión funcional de los circuitos córticoestriatales durante un período crítico de estos circuitos (Soiza-Reilly y Azcurra 2009) y posteriormente el refinamiento y retracción de los circuitos moldeado por la experiencia.

En este sentido, es importante distinguir si los cambios madurativos electrofisiológicos facilitados por la dopamina son el resultado de una acción crónica o aguda de la dopamina. Si bien no abordamos de manera directa esta pregunta, los resultados obtenidos por la administración de anfetamina indican que algunas características pueden revertir de manera aguda, como el enganche de fase, pero otras no, como la respuesta convergente a la estimulación cortical. Este resultado es consistente con la idea de que la dopamina ejerce un efecto estructural sobre el conexionado córticoestriatal que sería perdurable en el tiempo y que podría explicar algunas alteraciones funcionales en los ratones adultos. Modelos animales que permitan afectar transitoriamente los niveles de dopamina cerebrales, en distintas etapas del desarrollo, serán necesarios para contestar esta pregunta.

## **2. Establecimiento de los canales paralelos córticoestriatales y circuitos espirales.**

Es sabido que los GB están relacionados con la adquisición de condicionamientos pavlovianos, aprendizajes instrumentales de conductas orientadas a obtener metas y formación de hábitos (Balleine y col. 2009). Distintos canales córticoestriatales contribuirían con cada uno de estos aprendizajes, que constituyen sistemas funcionalmente independientes pero que expresan un alto grado de interacción (Yin y col. 2008). Esta interacción podría darse por diversos mecanismos y entre ellos, los circuitos "espirales" formados por conexiones GABAérgicas y dopaminérgicas estriato-nigro-estriatales, que conectan de manera serial los canales córticoestriatales, podrían ser importantes (Haber y col. 2000). Un estudio que combinó lesiones químicas con bloqueos farmacológicos intraestriatales durante la

adquisición de una conducta instrumental y posterior transformación en hábito aportó evidencia funcional de la comunicación entre canales a través de circuitos espirales (Belin y Everitt 2008). La lesión neonatal de neuronas dopaminérgicas desconectaría estos circuitos impidiendo la comunicación entre canales. En este contexto, la plasticidad cruzada entre canales córticoestriatales que encontramos en los ratones control, pero que no se expresa en los ratones lesionados, podría deberse a una desconexión de los circuitos espirales que no serían funcionales en los ratones con destrucción de las vías dopaminérgicas.

Sin embargo, la comunicación entre canales córticoestriatales puede darse a través de la superposición de dominios corticales en el territorio estriatal (Flaherty y Graybiel 1993). Dado que la plasticidad córticoestriatal sería un proceso fisiológico que se expresa durante el desarrollo es posible que las vías dopaminérgicas influyan de manera aguda sobre la función y durante el desarrollo sobre el establecimiento de los canales paralelos córticoestriatales. De hecho, las neuronas estriatales de ratones juveniles -en comparación con las de ratones adultos- muestran una elevada probabilidad de ser reclutadas por estímulos aplicados en dos canales distintos, mientras que la lesión dopaminérgica neonatal perturba esta propiedad del sistema durante la infancia. Entonces, la segregación en canales paralelos, característica de los GB adultos, es adquirida durante el desarrollo y es modulada por las vías dopaminérgicas.

Esta idea permite pensar que el conexionado de los circuitos córticoestriatales podría ser susceptible de sufrir alteraciones durante etapas críticas del desarrollo como consecuencia de la exposición a compuestos que actúen sobre el sistema dopaminérgico y alterar por lo tanto la conducta normal e incluso ser la base de comportamientos patológicos, como la adicción a drogas o los trastornos obsesivos compulsivos (Everitt y Robbins 2005). Por ejemplo, es sabido que la exposición a psicoestimulantes durante la infancia modifican el uso de cocaína tanto en ratas como en humanos (pacientes con ADHD) disminuyendo la probabilidad de abuso en humanos adolescentes y aumentando la probabilidad de convertirse en un estímulo aversivo en ratas adultas (Andersen y col. 2002; Stanwood y Levitt 2004). Es interesante que el balance de la fuerza del conexionado anátomo-

funcional entre los canales córticoestriatales podría ser el sustrato de algunos aspectos de la personalidad relacionados con la adicción a drogas y las conductas compulsivas (Cohen y col. 2009)

Desde un punto de vista anátomo-funcional, proponemos que la lesión dopaminérgica se traduciría, entonces, en la formación de canales paralelos altamente segregados con bajo nivel de comunicación entre sí. En este escenario, la progresión normal de la información entre canales en las distintas fases de un aprendizaje instrumental que involucrarían a distintos canales de manera serial estaría interrumpido en los ratones con lesión y afectaría por lo tanto la flexibilidad conductual. Un escenario posible sería que una vez que una conducta es adquirida y controlada por un canal de los GB, como por ejemplo un hábito, no pueda ser regulada posteriormente por los otros canales para "deshacer" ese hábito.

### **3. ¿Existe un rol madurativo de las interneuronas?**

Las interneuronas GABAérgicas extienden procesos axonales que abarcan grandes áreas estriatales y regulan la excitabilidad de las NEMs a través de un proceso de inhibición anterógrada (feedforward inhibition) acotando la expansión temporal de los trenes de potenciales de acción descargados por las NEMs (Tepper y col. 2004; Mallet y col. 2005). Gracias a su localización anatómica en el microcircuito estriatal, podrían actuar transversalmente sobre distintos canales córticoestriatales modulando la actividad de un gran número de NEMs simultáneamente. Durante el desarrollo postnatal, la maduración funcional y morfológica de las interneuronas ocurre más temprano que la maduración de las NEMs sugiriendo que las interneuronas además de regular la función del microcircuito estriatal podrían tener un rol en su maduración (Plotkin y col. 2005) (Chesselet y col. 2007) (Schlosser y col. 1999). Otras evidencias indican que las interneuronas son más excitables que las NEMs, que su función también puede ser modulada por las vías dopaminérgicas y que la lesión dopaminérgica neonatal reduce el número de un subtipo de interneuronas GABAérgicas estriatales hacia la cuarta semana de vida (Pezzi y col. 2005; Fino y col. 2007).

En este contexto, el deterioro en el enganche de fase córticoestriatal de los ratones juveniles lesionados hiperactivos podría reflejar una disminución de la inhibición anterógrada, en tanto que el aumento del enganche de fase en los ratones adultos podría ser fruto de la maduración postnatal de las interneuronas GABAérgicas. Este proceso madurativo también podría ser una explicación alternativa a la disminución ontogénica de la actividad espontánea estriatal que había sido interpretada como un proceso fisiológico de depresión córticoestriatal del desarrollo pero que podría reflejar el aumento del tono GABérgico dentro del estriado, tal como ha sido reportado en otras estructuras cerebrales. Dada la expansión de los árboles dendríticos de estas neuronas, también podrían estar relacionadas con la plasticidad cruzada entre canales paralelos córticoestriatales.

Por lo tanto, es interesante plantear la posibilidad de que la maduración de los circuitos córticoestriatales dependiente de dopamina ocurra, al menos en parte, a través de la maduración de las interneuronas GABAérgicas. Esta posibilidad es atractiva ya que desórdenes neuropsiquiátricos del desarrollo como la esquizofrenia y el síndrome de Gilles de la Tourette han sido relacionados con alteraciones en estas interneuronas (Kataoka y col. 2010).

#### **4. ¿La lesión dopaminérgica neonatal es un posible modelo de ADHD?**

Los hallazgos fisiológicos obtenidos en el modelo de lesión dopaminérgica neonatal presentan paralelismos interesantes con alteraciones anátomo-funcionales descritas en pacientes con ADHD. Por ejemplo, el volumen estriatal de sujetos control durante la infancia es significativamente mayor que el de pacientes con ADHD. Hacia el final de la adolescencia el estriado de los sujetos control se reduce de tamaño en mayor medida que el de los sujetos con ADHD, desapareciendo las diferencias entre ambos grupos y sugiriendo que la conectividad córticoestriatal "normal" es más profusa en la infancia y que se refina durante el desarrollo (Castellanos y col. 2002). Nuestros resultados también muestran una trayectoria madurativa convergente de ciertos parámetros córticoestriatales que parten de valores anormales en la infancia de los animales lesionados (enganche de fase, convergencia de entradas corticales). En este sentido, nuestros hallazgos podrían ser un correlato funcional de cambios

estructurales como los revelados en un estudio tractográfico que sugiere que la conectividad axonal córticoestriatal en pacientes con ADHD se encuentra desorganizada durante la infancia y adolescencia (Ashtari y col. 2005).

Desde un punto de vista funcional, la conectividad córticoestriatal en pacientes con ADHD está deteriorada respecto de sujetos normales y las diferencias revierten bajo el efecto de psicoestimulantes (Cao y col. 2009; Rubia y col. 2009). En los ratones con lesión neonatal, la disminución del enganche de fase también revierte con la administración de psicoestimulantes y este efecto se observa sólo en los ratones que desarrollan hiperlocomoción. Este resultado permite pensar entonces que la disminución de la conectividad funcional córticoestriatal podría ser un endofenotipo de la hiperactividad del ADHD. Aunque resulta atractivo establecer un paralelo entre el modelo de lesión dopaminérgica neonatal en ratones y el ADHD en humanos, existe, además de la falta de validez etiológica (ver Introducción), una serie de puntos controversiales que deberían ser clarificados. Por un lado, el aporte relativo de la corteza y del estriado, de los distintos canales córticoestriatales, o de otros sistemas de neurotransmisores sobre otras conductas asociadas al ADHD -diferentes de la hiperlocomoción- necesita ser más estudiado. Es llamativo que el énfasis en la producción de modelos animales ha sido puesto en la hiperactividad locomotora que puede ser confundida con otras alteraciones de la conducta como deficiencias de habituación o un acicalamiento exagerado y sobre todo cuando la conducta más prevalente en niños con ADHD probablemente sea el déficit de inhibición conductual (Nigg 2001; Castellanos y Tannock 2002). En nuestras condiciones experimentales no todos los ratones lesionados presentan el fenotipo hiperlocomotor durante la infancia y otros autores han reportado la presencia de otros déficit conductuales en relación a la inhibición conductual y el aprendizaje de conductas instrumentales que, especulativamente, podrían estar relacionados con otras alteraciones conductuales del ADHD (Avale y col. 2004a; Nemirovsky y col. 2009). Es posible, entonces, que la hiperactividad asociada a una disminución del enganche de fase córticoestriatal sea sólo uno de los posibles fenotipos conductuales inducidos por la lesión y que los ratones lesionados que no desarrollan hiperactividad presenten alteraciones de otras conductas (impulsividad, atención, perseverancia), que podrían ocurrir paralelamente a otras alteraciones electrofisiológicas córticoestriatales reportadas en esta tesis. Por otro

lado, dado que nuestro interés inicial en el modelo se centró en la conducta locomotora, el estudio de enganche de fase se concentró en la región dorsolateral del estriado, perteneciente al canal “motor” de los GB. Es posible entonces que los ratones lesionados no-hiperlocomotores presenten déficit cognitivos asociados con alteraciones de la conectividad funcional córticoestriatal en otros canales o con alteraciones de plasticidad sináptica que encontramos en el canal “límbico”.

Entonces, el modelo de lesión dopaminérgica neonatal podría ser útil para estudiar las bases neurofisiológicas de otras patologías asociadas al malfuncionamiento de los canales córticoestriatales, pero también para el estudio de otras conductas mediadas por los GB, como los aprendizajes instrumentales, la formación de hábitos y conductas perseverantes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Experimentos

Para evaluar las hipótesis de este proyecto decidimos estudiar aspectos de la conducta, fisiológicos o neuroquímicos en ratones con lesión neonatal de neuronas dopaminérgica y ratones con lesión simulada (ratones control) en dos etapas distintas del desarrollo postnatal. Evidencias experimentales sugieren que la adolescencia es una etapa crítica de la maduración de los circuitos corticales y córticoestriatales (Luna 2009). Por lo tanto para nuestros experimentos utilizamos ratones juveniles y adultos. De acuerdo a la bibliografía (Spear 2000) consideramos que la infancia de los ratones se expande desde antes del destete (día postnatal 21) y hasta la pubertad (día postnatal 40) y que la adultez comienza luego de finalizado el desarrollo sexual (semana postnatal 8). A fin de controlar una posible fuente de variabilidad, acotamos el rango de edad de los ratones elegidos para los experimentos a día postnatal 21 a 35 (infantes) y semana postnatal 12 a 15 (adultos)

### Modelo experimental: Lesión dopaminérgica neonatal.

La lesión de neuronas dopaminérgicas en ratones neonatos se obtuvo con la neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA). La 6-OHDA es una toxina específica de neuronas catecolaminérgicas gracias a que es sustrato de los mecanismos de recaptación presinápticos de dopamina y noradrenalina. La administración combinada de 6-OHDA con desipramina (DMI) -un inhibidor de la recaptación de noradrenalina- permite obtener lesiones selectivas de neuronas dopaminérgicas.

La implementación del modelo experimental en el Laboratorio de Fisiología de Circuitos Neuronales fue realizada de acuerdo al protocolo descrito por Avale y colaboradores (2004) utilizando la misma cepa de ratones (cepa exocriada CF-1 proveniente del bioterio central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales). Para obtener las crías de ratón realizamos un programa de exocria con apareos poligámicos (2 a 3 hembras por jaula) a fin de obtener camadas numerosas. Los animales fueron alojados en un bioterio con un ciclo de luz oscuridad 12:12, temperatura controlada (18~22°C) y acceso a agua y alimento ilimitado.

Dos días después del nacimiento (día postnatal 2) las crías macho de aproximadamente 2g de peso recibieron una dosis subcutánea de 20mg/kg de desipramina (DMI, bloqueante del transportador de noradrenalina) a fin de proteger a las neuronas noradrenérgicas de la 6-OHDA (Breese). Media hora más tarde, las crías fueron asignadas al azar al grupo control o experimental y anestesiadas por frío en hielo triturado y recibieron bilateralmente dos inyecciones intraventriculares de vehículo (grupo control: ácido ascórbico 0,1%) o de una solución de 6-hidroxidopamina (grupo experimental: 6-OHDA-HBr 12,5µg/1,5µl; MP Biomedicals, Alemania). Las inyecciones intraventriculares fueron realizadas bajo la lupa con ayuda de una jeringa de 25 µl (Hamilton) acoplada a una aguja 30 G (tipo Carpule) utilizando una bomba de micro-infusión (Bee, Bioanalytical Systems) a una velocidad constante de 1,25 µl/min. La aguja fue introducida manualmente en el cráneo de manera vertical, atravesando los tejidos blandos y la calota del animal (1,1mm por debajo de la piel). Los sitios de inyección fueron determinados a partir del *lambda* (1,5 mm anterior) y la línea media (0,6 mm lateral). Más del 95% de los ratones sobrevivieron a la cirugía y se recuperaron de la anestesia e inyecciones intracerebrales dentro de los 5 minutos de finalizada la segunda inyección; los ratones que no se recuperaron en ese período fueron sacrificados. Luego de la recuperación de la hipotermia las crías fueron devueltas a las jaulas con sus madres en grupos de hasta 8 crías por madre. Alrededor del día postnatal 24 las crías fueron destetadas y reubicadas al azar en jaulas de entre 6 y 8 ratones por jaula hasta el día de los experimentos.

### **Conducta locomotora**

Evaluamos la conducta locomotora de los ratones en un campo abierto durante un período de 30 minutos en la fase luminosa del ciclo luz:oscuridad. La arena conductual constituyó un ambiente novedoso para todos los ratones juveniles, ya que nunca habían sido expuestos al campo abierto. Para estudiar el efecto de la maduración sobre la conducta locomotora un grupo de ratones fue reevaluado en el mismo campo abierto varias semanas más tarde, durante la adultez. Para estudiar los efectos de la amfetamina (Sigma?), medimos la actividad de base en el campo abierto por 30 minutos y

administramos la anfetamina (4 mg/kg i.p.) en una jaula estándar. Entre 3 y 5 minutos luego de la inyección cada ratón fue devuelto a la misma arena para ser medidos durante 30 minutos adicionales. Antes de poner un ratón nuevo en el campo abierto, la arena se limpió con una solución de Tego 1%.

### ***Equipos de medición***

Un grupo de ratones fue medido en el "Campo abierto 1", un actómetro de fuerza (*force plate actometer*, Fowler y col. 2001) construido *ad-hoc* (Galiñanes 2003). La arena conductual de este equipo es un área cuadrada de 30 cm de lado con paredes laminadas de blanco de 20 cm de altura. El piso del equipo de plástico corrugado semi-transparente está acoplado a cuatro sensores de peso ubicados en las esquinas cuya función es sensor la posición del animal dentro del campo abierto. Cuanto más cerca se encuentra el animal de una esquina mayor es el peso relativo que mide ese sensor. Mediante la combinación lineal de las mediciones de los cuatro sensores es posible calcular la posición relativa en el eje x e y del campo abierto con una resolución espacial < 1 mm y una resolución temporal de 1 ms.

Otro grupo de ratones fue medido en el "Campo abierto 2". La arena conductual es un área cuadrada de 40 cm de lado y 40 cm de alto, construida en poliestireno de alto impacto negro. Los ratones fueron videograbados en el campo abierto con una cámara digital. Las trayectorias de los ratones en el campo abierto fueron reconstruidas utilizando un software de "*tracking*" (*Video Spot Tracker*, <http://cismm.cs.unc.edu/resources>).

Tanto para el caso de las mediciones en el Campo abierto 1 y 2 calculamos la distancia total recorrida a partir de la reconstrucción de la trayectoria de cada ratón.

## **Experimentos Electrofisiológicos**

### ***Anestesia y preparación experimental***

Todos los registros electrofisiológicos fueron realizados *in vivo* en ratones anestesiados con uretano (1,2 - 1,5 g/kg, i.p.). Bajo esta anestesia, la actividad global del cerebro se asemeja a la actividad de

sueño de onda lenta . Un anestésico local (0,1 ml de clorhidrato de bupivacaina, solución al 5%) fue administrado subcutáneamente en la zona de incisión 30 minutos antes de colocar al ratón en un marco estereotáxico. Con un torno de dentista se realizaron dos perforaciones en la calota por encima de la región frontal de la corteza y del estriado dorsolateral, de acuerdo al atlas de ratón de (Paxinos y Franklin 2001). A través de esas perforaciones se insertaron los electrodos para los registros de la actividad bioeléctrica. A lo largo del experimento, suplementos adicionales de uretano fueron administrados por vía subcutánea (0,3 g-kg s.c. cada 2 ó 3 horas) a fin de mantener un nivel constante de anestesia. El plano anestésico se evaluó periódicamente a través de la ausencia del reflejo de retirada del miembro trasero. Otra medida adicional utilizada para mantener condiciones comparables de registro entre experimentos fue la actividad electrocorticográfica. La temperatura de los animales se mantuvo constante a 37°C mediante una manta térmica controlada por retroalimentación (Fine Science Tools, Vancouver, Canadá).

### ***Tipos de registro***

Los distintos tipos de registro están sintetizados en el Cuadro M.1. En todos los experimentos se registró el electrocorticograma (ECoG) a través de un macroelectrodo bipolar concéntrico (SNE-100, Better Hospital Equipment, EEUU. Diámetro del contacto externo: 0,25 mm, diámetro del contacto interno: 0,1 mm, separación entre contactos: 0,75 mm, altura de cada contacto: 0,25 mm) implantado en la región motora de la corteza frontal (2 mm anterior al bregma, 1,3 mm lateral a la línea media y 1,1 mm por debajo de la superficie de la corteza; Franklin y Paxinos, 2000) de modo tal que el contacto externo quedara ubicado en la superficie de la corteza y el contacto interno en las capas profundas de la corteza. La señal de este electrodo permitió obtener un registro diferencial de la actividad de campo cortical (ECoG. Filtros: 0,1-300 Hz; amplificador: Lab1, Akonic, Buenos Aires, Argentina). En algunos experimentos estimulamos eléctricamente la corteza frontal a través de dos macroelectrodos (SNE-100, Better Hospital Equipment,) ubicados en las regiones cingular (2 mm anterior al bregma, 0,8 lateral a la línea media y 1,1 ventral a la superficie del cerebro) y prelímbica (2 mm anterior al bregma, 0,5 lateral a la línea media y 2,1 ventral a la superficie del cerebro).

Para llevar a cabo el objetivo de cada experimento, realizamos diferentes tipos de registro de la actividad electrofisiológica extracelular del estriado en simultáneo con el electrocorticograma.

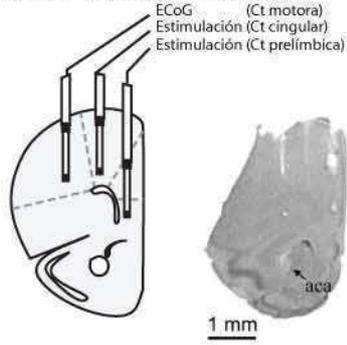
*Potenciales de acción con multielectrodo.* La serie de experimentos de la Sección II de los Resultados fueron realizados con un multielectrodo de 16 canales distribuidos en dos "patas" de 8 contactos cada una con una separación de 500  $\mu\text{m}$  y una separación vertical entre contactos de 200  $\mu\text{m}$  (NeuroNexus Technologies, Ann Arbor, MI). La señal proveniente de 12 de los 16 canales fue filtrada y amplificada (0,3-3 kHz, digitalizada a 20 kHz). El área relativamente grande y la impedancia relativamente baja de cada contacto permite registrar la actividad simultánea un volumen estriatal considerable y obtener potenciales de acción multiunitarios provenientes de varias neuronas. Las ventajas de esta tecnología (estabilidad de la señal a lo largo de horas de registro y el gran número de unidades registradas simultáneamente en un área extensa) la hacen conveniente para estudios farmacológicos (Zold y col. 2007). Implantamos este electrodo en la región dorsolateral de la porción rostral del estriado (ángulo de 20° en el plano coronal, 0,8~1,0 mm anterior al bregma, 2,5-3,0 mm lateral a la línea media y 3,0~3,2 mm debajo de la superficie del cerebro).

*Potenciales de acción con pipetas de vidrio.* La serie de experimentos de mapeo de la actividad estriatal de la Sección III y parte de los resultados de la Sección V fueron obtenidos con micropipetas de vidrio rellenas con NaCl 2M y 1% del colorante Chicago Sky Blue. La señal recogida por la pipeta de vidrio fue amplificada y filtrada (0,3-3 kHz, digitalizada a 10kHz). La impedancia relativamente alta de estos electrodos (5–12 M $\Omega$ , *in vitro* at 1 kHz) permite registrar la actividad electrofisiológica de un volumen extracelular acotado y por lo tanto obtener una gran proporción de registros con unidades aisladas (es decir registros de neuronas únicas), que resulta ventajoso para estudiar la tasa de descarga y la respuesta a la estimulación eléctrica de neuronas únicas. Por el contrario, electrodos de mayor área de contacto o menor impedancia favorecen la detección de potenciales de acción provenientes de múltiples unidades tanto en registros de actividad espontánea como evocada.

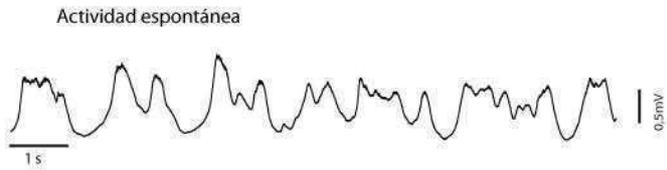
*Potenciales de campo evocados.* Los experimentos de plasticidad córticoestriatal de la Sección IV y V fueron realizados con un multielectrodo de 8 canales distribuidos en una "pata" con una separación

vertical de 200  $\mu\text{m}$  (NeuroNexus Technologies, Ann Arbor, MI). La señal recogida simultáneamente por los 8 canales fue amplificada y filtrada (0,1-300 Hz digitalizada 10 kHz). El área y la impedancia de estos contactos permite registrar el potencial de campo local estriatal con suficiente estabilidad para realizar registros de varias horas. Estudiamos la respuesta a la estimulación eléctrica de la región cingular y prelímbica de la corteza (potenciales de campo evocados) aplicando pulsos de corriente constante (0,3 ms de duración a 0,5 Hz, 100-500  $\mu\text{A}$ ). Este tipo de registros ha sido utilizado ampliamente *in vitro*, pero también *in vivo* para el estudio de plasticidad sináptica. En la literatura, especialmente *in vitro*, los potenciales de campo evocados son referidos como potenciales excitatorios poblacionales (*population EPSP*) o potenciales de acción poblacionales (*population spike*).

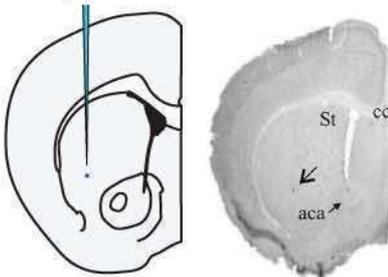
**Electrodos concéntricos bipolares**



**Electrocorticograma**



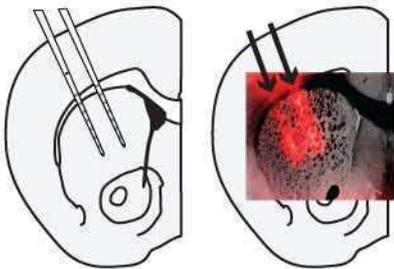
**Micropipeta de vidrio**



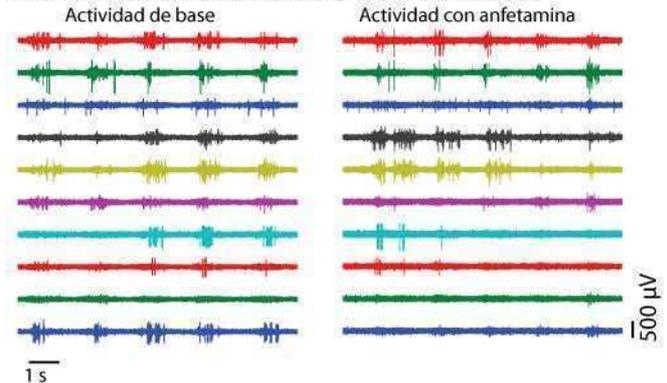
**Potenciales de acción extracelulares (pipeta de vidrio)**



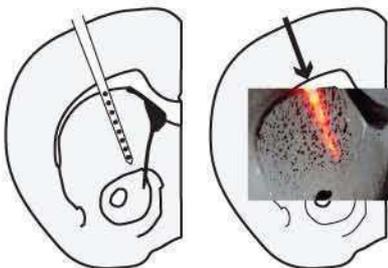
**Multielectrodo de 16 canales**



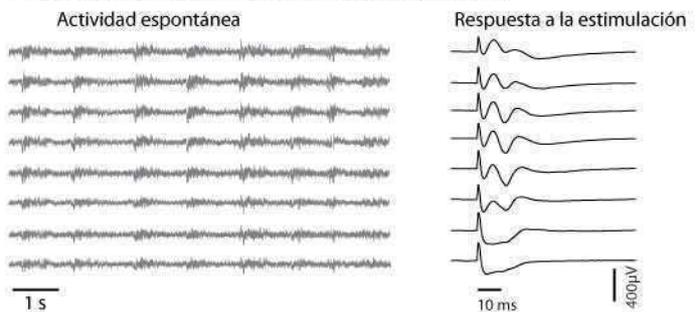
**Potenciales de acción extracelulares (multielectrodo)**



**Multielectrodo de 8 canales**



**Potenciales de campo estriales (multielectrodo)**



**Cuadro M.1 Verificación histológica y trazos representativos de la actividad electrofisiológica registrada.**

A la izquierda esquemas coronales de atlas de ratón representativos de las regiones de interés registradas electrofisiológicamente y el sitio de registro intentado. En el medio, fotomicrografías con la verificación histológica post-mortem de la ubicación final de los electrodos luego de los experimentos de electrofisiología. A la derecha trazados representativos de los registros electrofisiológicos obtenidos con cada tipo de electrodo.

### ***Estrategia experimental***

*Efecto de la anfetamina.* Para estudiar el efecto de la anfetamina sobre los circuitos córticoestriatales y establecer un correlato con el efecto conductual de la droga, registramos potenciales de acción estriatales con un multielectrodo de 16 canales (NeuroNexus). Luego de ubicar el multielectrodo en la región estriatal de interés, elegimos una posición final que maximizara el número de contactos con potenciales de acción espontáneos con buena relación señal:ruido. Luego de verificar la estabilidad del registro por al menos media hora, comenzamos a registrar la actividad espontánea en bloques de 3 minutos. Al cabo de al menos media hora de actividad de base, administramos anfetamina (la misma dosis utilizada para los experimentos conductuales) y registramos el efecto de la anfetamina por 30 – 45 minutos adicionales. Para facilitar el análisis posterior tuvimos especial cuidado durante el experimento de obtener tramos de actividad con el ECoG en estado de onda lenta. Adicionalmente, entre registros de actividad espontánea estudiamos el efecto de la estimulación cortical en la región prefrontal y cingular de la corteza frontal.

*Mapeo estriatal.* La estrategia de mapeo consistió en un relevamiento sistemático de todos los sitios con actividad espontánea en trazos verticales de 1~2 mm de longitud. Con un micromanipulador hidráulico (Stoelting, EEUU) avanzamos una micropipeta de vidrio a una velocidad de 10 a 20  $\mu\text{m}$  por minuto hasta alcanzar un sitio con descargas espontáneas. Utilizamos una velocidad de avance muy baja ya que las neuronas estriatales típicamente presentan tasas de descarga muy bajas en los animales anestesiados. Cada sitio activo fue registrado por al menos 3 minutos y las unidades que descargaban menos de 1 potencial de acción por minuto fueron descartadas de los análisis. Estudiamos también la respuesta de neuronas únicas a la estimulación eléctrica cortical (excitabilidad extrínseca) a través de los macroelectrodos implantados en las regiones cingular y prefrontal.

*Respuesta a la estimulación cortical.* Para estudiar la respuesta de neuronas estriatales aisladas (registradas con micropipetas) a la estimulación cortical, aplicamos series de 20~30 pulsos de corriente constante (0,3 ms de duración a 0,5 Hz, 100-500  $\mu\text{A}$ ; unidad de aislamiento Iso-Flex y estimulador Master 8, AMPI, Jerusalem, Israel) a través de los macroelectrodos implantados en la

región prefrontal o cingular de la corteza frontal. Dada la baja actividad espontánea de las neuronas estriatales, consideramos que una unidad respondía a la estimulación eléctrica si descargaba potenciales de acción por lo menos en el 20% de los eventos de estimulación a la máxima corriente evaluada (500  $\mu$ A) entre 10 y 15 ms después de la estimulación cortical. Para varias unidades aisladas pudimos determinar una corriente de estimulación que evocaba descargas en aproximadamente el 50% de los eventos de estimulación y esa intensidad de corriente la llamamos I50%.

*Plasticidad córticoestriatal.* Para estudiar la plasticidad córticoestriatal medimos los potenciales de campo estriatales evocados por estímulos en la corteza frontal antes y después de la aplicación de un protocolo de estimulación de alta frecuencia (protocolo de plasticidad). Estudiamos la fuerza de la conectividad córticoestriatal durante un período de base a través de 4 bloques de estimulación cortical (período control) y evaluamos el efecto de largo término causado por la estimulación de alta frecuencia con 6 bloques adicionales de estimulación (período “test”). Cada bloque de estimulación consistió en 50 pulsos pareados (intervalo entre pares de pulsos 50 ms) aplicados una vez cada 5 segundos. La intensidad de estimulación fue de 350  $\mu$ A (pulsos cuadrados de corriente constante de 0,3 ms de duración).

El protocolo de estimulación de alta frecuencia consistió en 4 trenes de 100 pulsos a 750  $\mu$ A y 1 segundo de duración. La separación entre trenes fue de 10 segundos. En **todos** los experimentos de plasticidad la estimulación de alta frecuencia se aplicó a la región prefrontal de la corteza frontal y se midió el cambio de la amplitud de los potenciales estriatales evocados por estimulación en la misma región cortical (plasticidad *homotípica* o directa). En algunos experimentos fue posible medir la respuesta evocada a estímulos aplicados en la corteza cingular y estudiamos en estos experimentos la plasticidad *heterotípica* o cruzada

Una esquematización de la estrategia de plasticidad sináptica junto con una caracterización de los potenciales de campo puede verse en el Cuadro M.3.

## **Análisis de señal**

El análisis de los registros electrofisiológicos fue llevado a cabo mediante rutinas programadas en Matlab.

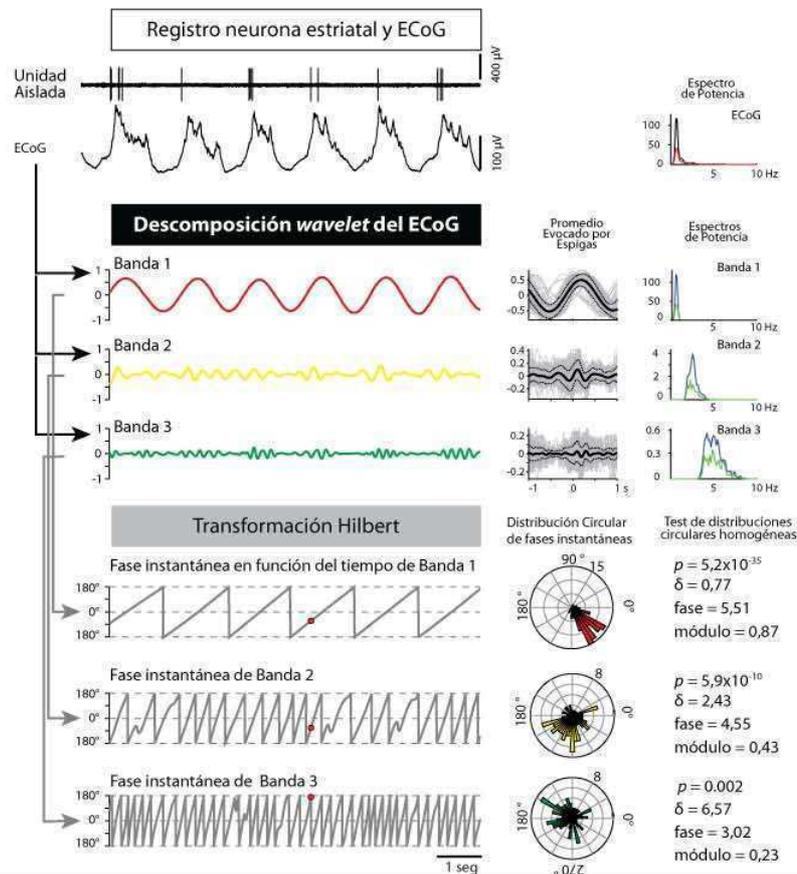
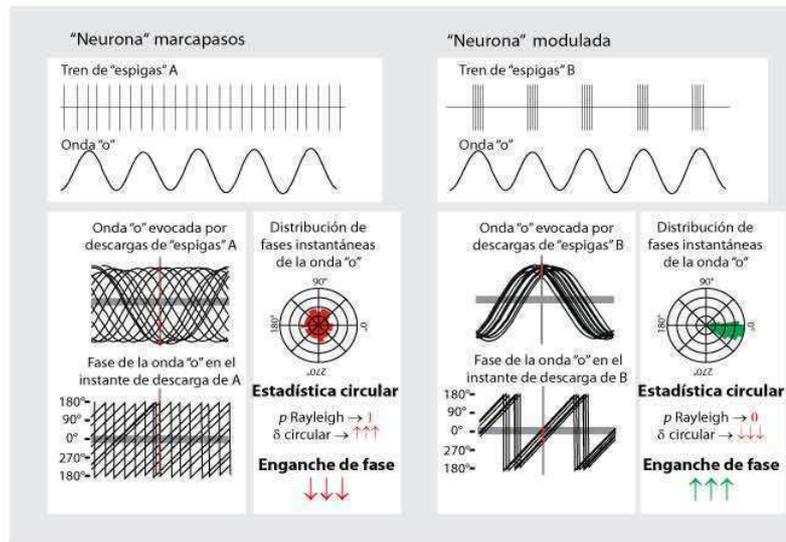
*Clasificación de espigas multiunitarias.* Los potenciales de acción extracelulares multiunitarios registrados con los multielectrodos NeuroNexus fueron clasificados con una rutina de análisis semiautomática (*Wave\_Clus*, Quian Quiroga 2004) utilizando criterios previamente publicados por el laboratorio (Zold 2007) con el fin de individualizar los potenciales de acción proveniente de neuronas diferentes. Brevemente, la rutina extrae características de la forma de onda de las espigas registradas y realiza una clasificación automática en “unidades” a través de una técnica superparamagnética. Mediante la modificación de un parámetro llamado “Temperatura” se puede variar el nivel de permisividad o estrictez con el que una espiga es considerada que pertenece a una unidad o es clasificada como ruido. A mayores temperaturas las espigas son clasificadas en una gran cantidad de unidades diferentes y a menores temperaturas todas las espigas son clasificadas en una misma unidad. La utilización de criterios de clasificación estrictos aumenta la probabilidad de que todas las espigas clasificadas en una unidad provengan de la misma neurona, pero paralelamente aumenta el riesgo de que algunas espigas de esa neurona sean clasificadas como ruido o pertenecientes a una unidad diferente. Mediante la inspección visual de la forma de onda de las espigas, de los histogramas inter-espigas y utilizando criterios estrictos de clasificación recuperamos un máximo de 3 unidades diferentes por sitio de registro correspondientes a neuronas únicas (Zold 2007). Utilizamos criterios tan estrictos para aumentar la robustez de los estudios de conectividad funcional córticoestriatal (ver más adelante).

*Clasificación de espigas registradas con micropipetas.* Los potenciales de acción registrados con pipetas de vidrio de los experimentos de mapeo estriatal generalmente correspondían a unidades únicas y por lo tanto fueron extraídos del ruido por discriminación de amplitud, es decir, se recuperó las espigas de potencial extracelular que tuvieran una relación señal:ruido mayor a dos. Si bien los registros extracelulares con pipetas de vidrio favorecen el registro de potenciales de acción

provenientes de una única neurona, es posible registrar potenciales de acción multiunitarios en los casos en que cerca del sitio de registro hay un conglomerado de neuronas espontáneamente activas. Entonces, de acuerdo a esto, los sitios registrados fueron clasificados como sitios con unidades aisladas o sitios con conglomerado de neuronas. El mapeo sistemático de la actividad espontánea estriatal permitió estimar la densidad de neuronas espontáneamente activas a partir del número total de sitios espontáneamente activos y la longitud total del trazo de registro.

*Descomposición wavelet y enganche de fase.* Para estudiar la conectividad funcional entre la corteza y el estriado estudiamos distintos rangos de la actividad frecuencial del electrocorticograma. Mediante una transformación *wavelet* filtramos el ECoG en tres bandas que retuvieron distintos componentes frecuenciales. La *banda 1* retuvo la actividad entre 0,4 y 1 Hz con un pico espectral alrededor de 0,8 Hz, la *banda 2* entre 1,5 y 4 Hz con pico en 2,2 Hz y la *banda 3* entre 4 y 10 Hz. Las *bandas 1, 2 y 3* fueron procesadas para calcular la fase instantánea con una resolución temporal de 2 ms utilizando la transformada de Hilbert (Kasanetz 2006).

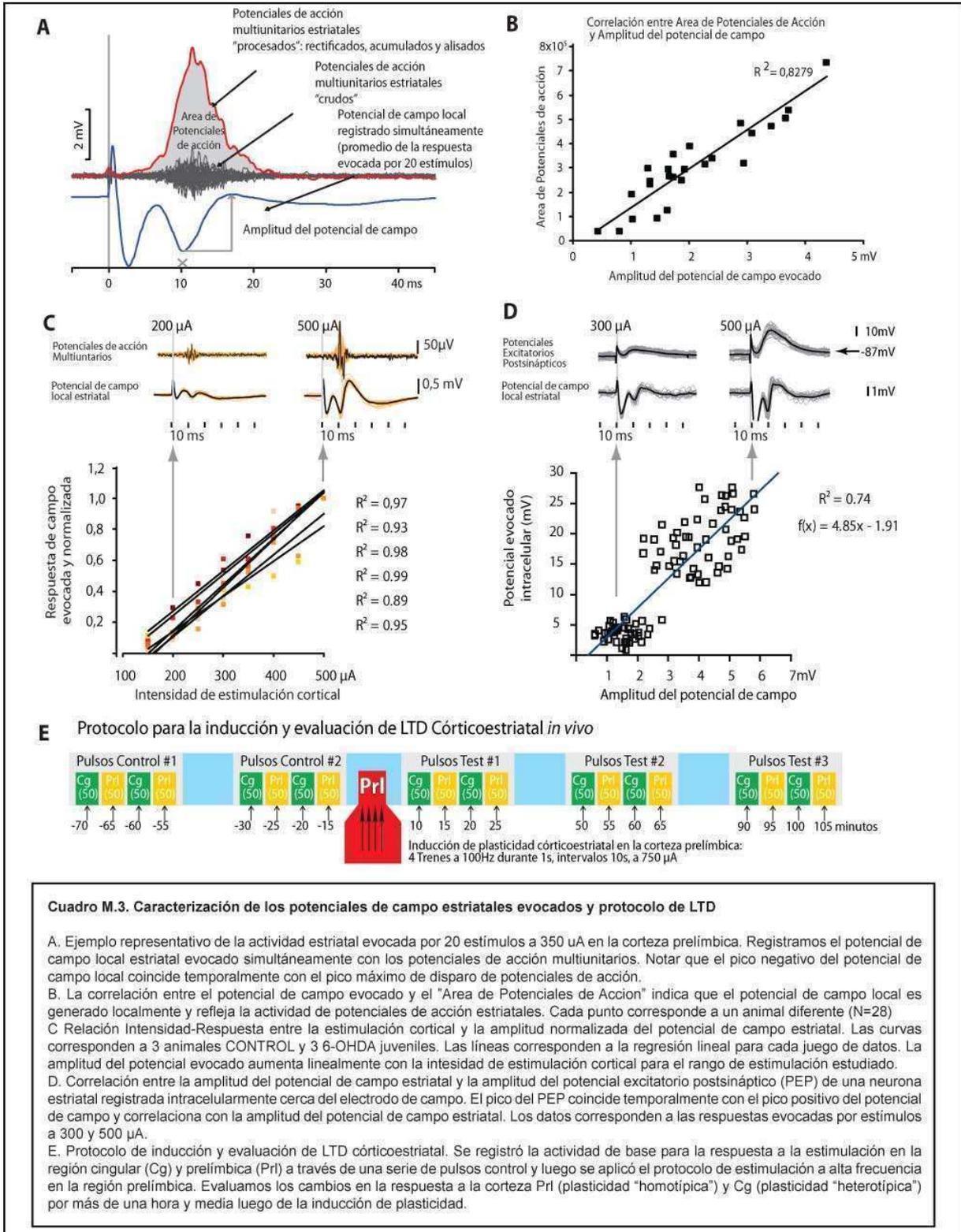
Estudiamos la conectividad funcional córticoestriatal a través del enganche de fase entre los trenes de potenciales de acción de las neurona estriatales y las *bandas 1, 2 y 3* del ECoG. Para cada par neurona estriatal - ECoG registrados simultáneamente, computamos cuál era la fase instantánea de las bandas 1, 2 y 3 en el momento en que la neurona estriatal descargaba potenciales de acción. El conjunto de fases instantáneas para cada banda fue analizado mediante estadística circular con el test de Rayleigh de distribuciones circulares uniformes. Si la descarga de potenciales de acción ocurre en cualquier fase de la onda entonces la distribución circular será uniforme. Por el contrario, si los potenciales de acción estriatales ocurren en una fase “preferida” de la actividad cortical la distribución circular será no-uniforme. El valor del estadístico  $p$  del test de Rayleigh permite estimar la desviación de la uniformidad y el parámetro dispersión circular permite estimar la concentración de la descarga de potenciales de acción alrededor de una fase determinada de la onda cortical (Fisher 1993). Utilizamos ambos parámetros como estimadores del enganche de fase córticoestriatal (Siapas 2005). La técnica de enganche de fase es sensible al número total de eventos analizados, por lo tanto las unidades que descargaron menos de 30 potenciales de acción durante el registro no fueron incluídas en el análisis.



**Cuadro M.2 Estudio del enganche de fase y descomposición wavelet**

El cuadro superior es una caricatura de dos neuronas hipotéticas con actividad tónica (independiente) y otra con actividad fásica (modulada) por la onda "o". Mediante el estudio de la distribución de fases instantáneas, si la "neurona" descarga en cualquier fase de la onda "o", el valor estadístico  $p$  del test de Rayleigh para distribuciones circulares uniformes tenderá a 1 y la dispersión circular ( $\delta$ ) tomará valores crecientes, indicando un bajo enganche de fase. Por el contrario, si la neurona descarga en una fase preferida de la onda "o" el estadístico  $p$  de Rayleigh tiende a cero y la dispersión circular toma valores bajos, indicando un alto enganche de fase (Siapas y col 2005, Fisher 1993). La parte inferior de la figura corresponde a un registro real del electrocorticograma (ECoG) y una neurona estriatal a los que les estudiamos el enganche de fase. El ECoG es filtrado utilizando una transformación wavelet y las fases instantáneas de cada transformada se obtienen a partir de la función de Hilbert (Kasanez y col. 2006)

*Potenciales de campo evocados.* Caracterizamos los potenciales evocados que correlacionan con la descarga de potenciales de acción estriales y con los potenciales despolarizantes postsinápticos (Cuadro M.3). Gracias a su gran estabilidad resultan adecuados para estudiar procesos de larga duración, como la plasticidad sináptica.



**Cuadro M.3. Caracterización de los potenciales de campo estriales evocados y protocolo de LTD**

A. Ejemplo representativo de la actividad estriatal evocada por 20 estímulos a 350  $\mu$ A en la corteza prefrontal. Registramos el potencial de campo local estriatal evocado simultáneamente con los potenciales de acción multiunitarios. Notar que el pico negativo del potencial de campo local coincide temporalmente con el pico máximo de disparo de potenciales de acción.

B. La correlación entre el potencial de campo evocado y el "Área de Potenciales de Acción" indica que el potencial de campo local es generado localmente y refleja la actividad de potenciales de acción estriales. Cada punto corresponde a un animal diferente (N=28).

C. Relación Intensidad-Respuesta entre la estimulación cortical y la amplitud normalizada del potencial de campo estriatal. Las curvas corresponden a 3 animales CONTROL y 3 6-OHDA juveniles. Las líneas corresponden a la regresión lineal para cada juego de datos. La amplitud del potencial evocado aumenta linealmente con la intensidad de estimulación cortical para el rango de estimulación estudiado.

D. Correlación entre la amplitud del potencial de campo estriatal y la amplitud del potencial excitatorio postsináptico (PEP) de una neurona estriatal registrada intracelularmente cerca del electrodo de campo. El pico del PEP coincide temporalmente con el pico positivo del potencial de campo y correlaciona con la amplitud del potencial de campo estriatal. Los datos corresponden a las respuestas evocadas por estímulos a 300 y 500  $\mu$ A.

E. Protocolo de inducción y evaluación de LTD córticoestriatal. Se registró la actividad de base para la respuesta a la estimulación en la región cingular (Cg) y prefrontal (Pr) a través de una serie de pulsos control y luego se aplicó el protocolo de estimulación a alta frecuencia en la región prefrontal. Evaluamos los cambios en la respuesta a la estimulación a la corteza Pr (plasticidad "homotípica") y Cg (plasticidad "heterotípica") por más de una hora y media luego de la inducción de plasticidad.

## **Histología**

Al finalizar los experimentos electrofisiológicos los ratones recibieron una dosis letal de uretano y fueron perfundidos tanscardíacamente con 10 ml de salina fría y 20 ml de paraformaldehido 4% en buffer fosfato 0,1M. Los cerebros fueron extraídos y crioprotectados en una solución PB 0,1M y 15% sacarosa para ser procesados histológicamente. El tejido fue cortado en un micrótopo de congelación en secciones coronales de 40 µm. Los cortes fueron preservados en una solución de PB 0,1M con azida de sodio 0,1%.

### ***Verificación histológica de los sitios de registro electrofisiológicos***

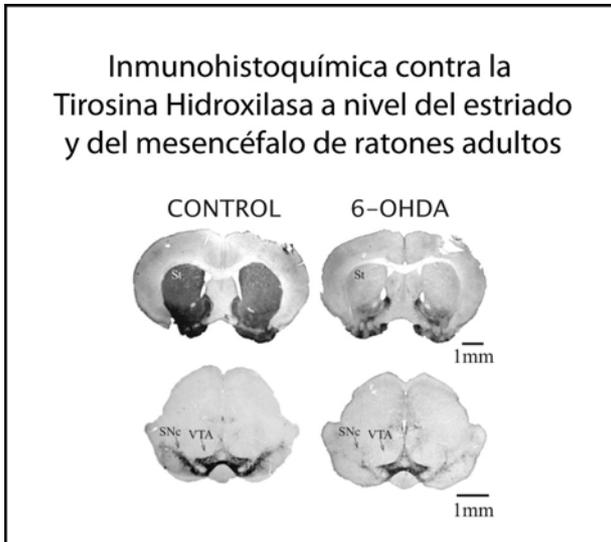
La localización de los macroelectrodos implantados en la corteza se verificó mediante la tinción de nissl con el colorante safranina (0,2% en solución de ácido acético al 1%). Al finalizar los registros con micropipetas de vidrio se realizó un depósito iontoforético de chicao sky blue que se utilizó para reconstruir los trazos realizados. La localización de la posición final de los multielectrodos NeuroNexus se confirmó mediante la visualización de un depósito a lo largo del trazo del electrodo del compuesto fluorescente DiI (Cuadro M.1)

### ***Inmunohistoquímica contra la tirosina hidroxilasa***

Para evaluar el grado de lesión del sistema dopaminérgico nigroestriatal provocado por la 6-OHDA realizamos una técnica de inmunohistoquímica para detectar la enzima tirosina hidroxilasa en secciones del estriato y la sustancia nigra, sitios donde se encuentran las terminaciones sinápticas y los somas de las neuronas dopaminérgicas respectivamente. Los cortes fueron preincubados con albúmina bovina 1% (en PBS 0,1M) para reducir la unión inespecífica de los anticuerpos, luego fueron incubados con el anticuerpo policlonal primario dirigido contra la enzima tirosina hidroxilasa (anti-TH P40101-0, Pel-Freez, en 1:1000 en PBS 0,1M y timerosal 0,02%) durante 24-48 hs. La detección de la enzima se realizó por exposición a un anticuerpo secundario biotinilado (anticonejo de Vector Labs, 1:200 en PBS 0,1M y timerosal 0,02%) y posterior incubación con un complejo biotina-estreptavidina-peroxidasa (complejo AB 1:100 en PBS 0,1M) (ABC Elite, Vector Labs). El revelado se llevó a cabo con diaminobenzidina (DAB). (Adelbrecht y col 1997). La tirosina hidroxilasa es la enzima limitante

en la síntesis de catecolaminas y está presente únicamente en neuronas catecolaminérgicas (revisado por Flatmark, 2000).

### ***Inmunohistoquímica contra el transportador de serotonina***



Para estudiar la hiperinervación serotoninérgica estriatal, que es un fenómeno compensatorio a la lesión dopaminérgica neonatal realizamos ensayos inmunohistoquímicos para detectar la presencia de fibras serotoninérgicas estriatales utilizando el transportador de serotonina (SERT, Avale). Las secciones que contenían la región frontal del estriado fueron preincubados en suero normal

de cabra (NGS) al 4% (en PBS 0,1%, tritón X-100 0,25%) e incubados a temperatura ambiente durante 12 horas con un anticuerpo policlonal primario (anti-SERT PC177L, Calbiochem, 1:4000 en PBS 0,1 M, Tritón X-100 0,15%, NGS 2%). La detección de la enzima se realizó por exposición a un anticuerpo secundario biotinilado (anticonejo de Vector Labs, 1:250 en PBS 0,1M y Tritón X-100 0,25%) y posterior incubación con un complejo biotina-estreptavidina-peroxidasa (complejo AB 1:125 en PBS 0,1M, ABC Elite, Vector Labs). El revelado se llevó a cabo con DAB.

### ***Análisis de las reacciones inmunohistoquímicas***

Para realizar las mediciones cuantitativas y semi-cuantitativas de neuronas dopaminérgicas y densidad de fibras dopaminérgicas residuales y la hiperinervación serotoninérgica estriatal, el revelado de las reacciones inmunohistoquímicas con DAB se llevó a cabo controlando el tiempo de reacción a 4 minutos revelando simultáneamente cortes correspondientes a todos los animales (control y lesionados) de cada grupo experimental.

Las secciones fueron visualizadas con un microscopio Eclipse 50i (Nikon) equipado con una cámara digital de alta calidad (Optronics MicroFire S99808). Contabilizamos el número de neuronas TH+ en

la sustancia negra y el área tegmental ventral en tres secciones por ratón, localizadas 3,0 3,28 y 3,52 mm caudal al bregma (Franklin y Paxinos). Todos los somas con un núcleo y al menos un proceso fueron contadas con un sistema semiautomático que permite marcar digitalmente la posición de las células contadas (Mercator Pro, ExploraNova). Dado que el estriado de los ratones con lesión dopaminérgica neonatal presenta células TH+ (Huot and Parent, 2007), también contabilizamos estas neuronas en los ratones lesionados en un área de 0,16 mm<sup>2</sup> en el estriado dorsal y en el núcleo accumbens; la alta densidad de fibras dopaminérgicas estriatales imposibilitó detectar la presencia de este tipo de neuronas en los ratones del grupo control.

Para estimar de modo semicuantitativo la inervación dopaminérgica (TH) y serotoninérgica (SERT) medimos la densidad óptica (DO) en regiones del prosencéfalo utilizando el atlas de ratón de Franklin y Paxinos (2001) para delinear las estructuras de interés. Las mediciones para la TH y para la SERT fueron realizadas en ambos hemisferios utilizando dos secciones coronales. Los valores de DO fueron obtenidos mediante la conversión de las imágenes digitalizadas en iguales condiciones de luminosidad a una escala de 256 valores de escala de grises con el software *ImageJ* (NIH). La marcación inespecífica (*background*) medida como la DO del cuerpo calloso fue sustraída de las regiones de interés.

## CITAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ade KK y Lovinger DM** (2007). "Anandamide regulates postnatal development of long-term synaptic plasticity in the rat dorsolateral striatum." J Neurosci **27**(9): 2403-2409.
- Adermark L y Lovinger DM** (2007). "Combined activation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels and synaptic transmission is sufficient to induce striatal long-term depression." J Neurosci **27**(25): 6781-6787.
- Adermark L, Talani G y Lovinger DM** (2009). "Endocannabinoid-dependent plasticity at GABAergic and glutamatergic synapses in the striatum is regulated by synaptic activity." Eur J Neurosci **29**(1): 32-41.
- Alexander GE y Crutcher MD** (1990). "Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing." Trends Neurosci **13**(7): 266-271.
- Alexander GE, DeLong MR y Strick PL** (1986). "Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex." Annu Rev Neurosci **9**: 357-381.
- Alloway KD, Mutic JJ, Hoffer ZS y Hoover JE** (2000). "Overlapping corticostriatal projections from the rodent vibrissal representations in primary and secondary somatosensory cortex." J Comp Neurol **426**(1): 51-67.
- Andersen SL, Arvanitogiannis A, Pliakas AM, LeBlanc C y Carlezon WA, Jr.** (2002). "Altered responsiveness to cocaine in rats exposed to methylphenidate during development." Nat Neurosci **5**(1): 13-14.
- Andersen SL, Thompson AT, Rutstein M, Hostetter JC y Teicher MH** (2000). "Dopamine receptor pruning in prefrontal cortex during the periadolescent period in rats." Synapse **37**(2): 167-169.
- Archer T, Danysz W, Fredriksson A, Jonsson G, Luthman J, Sundstrom E y Teiling A** (1988). "Neonatal 6-hydroxydopamine-induced dopamine depletions: motor activity and performance in maze learning." Pharmacol Biochem Behav **31**(2): 357-364.
- Arnsten AF** (2006). "Stimulants: Therapeutic actions in ADHD." Neuropsychopharmacology **31**(11): 2376-2383.
- Ashtari M, Kumra S, Bhaskar SL, Clarke T, Thaden E, Cervellione KL, Rhinewine J, Kane JM, Adelman A, Milanaik R, Maytal J, Diamond A, Szeszko P y Ardekani BA** (2005). "Attention-deficit/hyperactivity disorder: a preliminary diffusion tensor imaging study." Biol Psychiatry **57**(5): 448-455.
- Avale ME, Falzone TL, Gelman DM, Low MJ, Grandy DK y Rubinstein M** (2004a). "The dopamine D4 receptor is essential for hyperactivity and impaired behavioral inhibition in a mouse model of attention deficit/hyperactivity disorder." Mol Psychiatry **9**(7): 718-726.

- Avale ME, Nemirovsky SI, Raisman-Vozari R y Rubinstein M** (2004b). "Elevated serotonin is involved in hyperactivity but not in the paradoxical effect of amphetamine in mice neonatally lesioned with 6-hydroxydopamine." J Neurosci Res **78**(2): 289-296.
- Balleine BW, Liljeholm M y Ostlund SB** (2009). "The integrative function of the basal ganglia in instrumental conditioning." Behav Brain Res **199**(1): 43-52.
- Belin D y Everitt BJ** (2008). "Cocaine seeking habits depend upon dopamine-dependent serial connectivity linking the ventral with the dorsal striatum." Neuron **57**(3): 432-441.
- Biederman J y Faraone SV** (2005). "Attention-deficit hyperactivity disorder." Lancet **366**(9481): 237-248.
- Blankenship AG y Feller MB** (2010). "Mechanisms underlying spontaneous patterned activity in developing neural circuits." Nat Rev Neurosci **11**(1): 18-29.
- Bliss TV y Gardner-Medwin AR** (1973). "Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path." J Physiol **232**(2): 357-374.
- Bolam JP, Hanley JJ, Booth PA y Bevan MD** (2000). "Synaptic organisation of the basal ganglia." J Anat **196** (Pt 4): 527-542.
- Bonsi P, Pisani A, Bernardi G y Calabresi P** (2003). "Stimulus frequency, calcium levels and striatal synaptic plasticity." Neuroreport **14**(3): 419-422.
- Breese GR, Knapp DJ, Criswell HE, Moy SS, Papadeas ST y Blake BL** (2005). "The neonate-6-hydroxydopamine-lesioned rat: a model for clinical neuroscience and neurobiological principles." Brain Res Brain Res Rev **48**(1): 57-73.
- Broyd SJ, Demanuele C, Debener S, Helps SK, James CJ y Sonuga-Barke EJ** (2009). "Default-mode brain dysfunction in mental disorders: a systematic review." Neurosci Biobehav Rev **33**(3): 279-296.
- Brus R, Nowak P, Szkilnik R, Mikolajun U y Kostrzewa RM** (2004). "Serotonergics attenuate hyperlocomotor activity in rats. Potential new therapeutic strategy for hyperactivity." Neurotox Res **6**(4): 317-325.
- Butler AK, Uryu K y Chesselet MF** (1998). "A role for N-methyl-D-aspartate receptors in the regulation of synaptogenesis and expression of the polysialylated form of the neural cell adhesion molecule in the developing striatum." Dev Neurosci **20**(2-3): 253-262.
- Calabresi P, Maj R, Pisani A, Mercuri NB y Bernardi G** (1992). "Long-term synaptic depression in the striatum: physiological and pharmacological characterization." J Neurosci **12**(11): 4224-4233.
- Calabresi P, Mercuri NB y Di Filippo M** (2009). "Synaptic plasticity, dopamine and Parkinson's disease: one step ahead." Brain **132**(Pt 2): 285-287.

- Calabresi P, Picconi B, Tozzi A y Di Filippo M** (2007). "Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity." Trends Neurosci **30**(5): 211-219.
- Calabresi P, Pisani A, Centonze D y Bernardi G** (1997). "Synaptic plasticity and physiological interactions between dopamine and glutamate in the striatum." Neurosci Biobehav Rev **21**(4): 519-523.
- Cao X, Cao Q, Long X, Sun L, Sui M, Zhu C, Zuo X, Zang Y y Wang Y** (2009). "Abnormal resting-state functional connectivity patterns of the putamen in medication-naive children with attention deficit hyperactivity disorder." Brain Res **1303**: 195-206.
- Castellanos FX, Lee PP, Sharp W, Jeffries NO, Greenstein DK, Clasen LS, Blumenthal JD, James RS, Ebens CL, Walter JM, Zijdenbos A, Evans AC, Giedd JN y Rapoport JL** (2002). "Developmental trajectories of brain volume abnormalities in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder." Jama **288**(14): 1740-1748.
- Castellanos FX y Tannock R** (2002). "Neuroscience of attention-deficit/hyperactivity disorder: the search for endophenotypes." Nat Rev Neurosci **3**(8): 617-628.
- Charpier S y Deniau JM** (1997). "In vivo activity-dependent plasticity at cortico-striatal connections: evidence for physiological long-term potentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(13): 7036-7040.
- Charpier S, Mahon S y Deniau JM** (1999). "In vivo induction of striatal long-term potentiation by low-frequency stimulation of the cerebral cortex." Neuroscience **91**(4): 1209-1222.
- Chesselet MF, Plotkin JL, Wu N y Levine MS** (2007). "Development of striatal fast-spiking GABAergic interneurons." Prog Brain Res **160**: 261-272.
- Chevalyere V, Heifets BD, Kaeser PS, Sudhof TC y Castillo PE** (2007). "Endocannabinoid-mediated long-term plasticity requires cAMP/PKA signaling and RIM1alpha." Neuron **54**(5): 801-812.
- Choi S y Lovinger DM** (1997). "Decreased probability of neurotransmitter release underlies striatal long-term depression and postnatal development of corticostriatal synapses." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(6): 2665-2670.
- Cohen MX, Schoene-Bake JC, Elger CE y Weber B** (2009). "Connectivity-based segregation of the human striatum predicts personality characteristics." Nat Neurosci **12**(1): 32-34.
- Cook EH, Jr., Stein MA, Krasowski MD, Cox NJ, Olkon DM, Kieffer JE y Leventhal BL** (1995). "Association of attention-deficit disorder and the dopamine transporter gene." Am J Hum Genet **56**(4): 993-998.
- Costa RM, Cohen D y Nicoletis MA** (2004). "Differential corticostriatal plasticity during fast and slow motor skill learning in mice." Curr Biol **14**(13): 1124-1134.

- Dauids E, Zhang K, Kula NS, Tarazi FI y Baldessarini RJ** (2002). "Effects of norepinephrine and serotonin transporter inhibitors on hyperactivity induced by neonatal 6-hydroxydopamine lesioning in rats." J Pharmacol Exp Ther **301**(3): 1097-1102.
- Dauids E, Zhang K, Tarazi FI y Baldessarini RJ** (2003). "Animal models of attention-deficit hyperactivity disorder." Brain Res Brain Res Rev **42**(1): 1-21.
- Day M, Wang Z, Ding J, An X, Ingham CA, Shering AF, Wokosin D, Ilijic E, Sun Z, Sampson AR, Mugnaini E, Deutch AY, Sesack SR, Arbuthnott GW y Surmeier DJ** (2006). "Selective elimination of glutamatergic synapses on striatopallidal neurons in Parkinson disease models." Nat Neurosci **9**(2): 251-259.
- DeFrance JF, Sikes RW y Chronister RB** (1985). "Dopamine action in the nucleus accumbens." J Neurophysiol **54**(6): 1568-1577.
- Destexhe A, Hughes SW, Rudolph M y Crunelli V** (2007). "Are corticothalamic 'up' states fragments of wakefulness?" Trends Neurosci **30**(7): 334-342.
- Dias-Ferreira E, Sousa JC, Melo I, Morgado P, Mesquita AR, Cerqueira JJ, Costa RM y Sousa N** (2009). "Chronic stress causes frontostriatal reorganization and affects decision-making." Science **325**(5940): 621-625.
- Drevets WC, Gautier C, Price JC, Kupfer DJ, Kinahan PE, Grace AA, Price JL y Mathis CA** (2001). "Amphetamine-induced dopamine release in human ventral striatum correlates with euphoria." Biol Psychiatry **49**(2): 81-96.
- Dudek SM y Bear MF** (1992). "Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(10): 4363-4367.
- Durston S, Fossella JA, Casey BJ, Hulshoff Pol HE, Galvan A, Schnack HG, Steenhuis MP, Minderaa RB, Buitelaar JK, Kahn RS y van Engeland H** (2005). "Differential effects of DRD4 and DAT1 genotype on fronto-striatal gray matter volumes in a sample of subjects with attention deficit hyperactivity disorder, their unaffected siblings, and controls." Mol Psychiatry **10**(7): 678-685.
- Durston S, Tottenham NT, Thomas KM, Davidson MC, Eigsti IM, Yang Y, Ulug AM y Casey BJ** (2003). "Differential patterns of striatal activation in young children with and without ADHD." Biol Psychiatry **53**(10): 871-878.
- Engert F y Bonhoeffer T** (1999). "Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity." Nature **399**(6731): 66-70.
- Everitt BJ y Robbins TW** (2005). "Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion." Nat Neurosci **8**(11): 1481-1489.

- Faraone SV y Biederman J** (1998). "Neurobiology of attention-deficit hyperactivity disorder." Biol Psychiatry **44**(10): 951-958.
- Fino E, Glowinski J y Venance L** (2005). "Bidirectional activity-dependent plasticity at corticostriatal synapses." J Neurosci **25**(49): 11279-11287.
- Fino E, Glowinski J y Venance L** (2007). "Effects of acute dopamine depletion on the electrophysiological properties of striatal neurons." Neurosci Res **58**(3): 305-316.
- Fisher NI** (1993). Statistical analysis of circular data. Cambridge England ; New York, NY, USA, Cambridge University Press.
- Flaherty AW y Graybiel AM** (1993). "Two input systems for body representations in the primate striatal matrix: experimental evidence in the squirrel monkey." J Neurosci **13**(3): 1120-1137.
- Fowler SC, Birkestrand BR, Chen R, Moss SJ, Vorontsova E, Wang G y Zarccone TJ** (2001). "A force-plate actometer for quantitating rodent behaviors: illustrative data on locomotion, rotation, spatial patterning, stereotypies, and tremor." J Neurosci Methods **107**(1-2): 107-124.
- Gainetdinov RR, Wetsel WC, Jones SR, Levin ED, Jaber M y Caron MG** (1999). "Role of serotonin in the paradoxical calming effect of psychostimulants on hyperactivity." Science **283**(5400): 397-401.
- Geranton SM, Heal DJ y Stanford SC** (2003). "Differences in the mechanisms that increase noradrenaline efflux after administration of d-amphetamine: a dual-probe microdialysis study in rat frontal cortex and hypothalamus." Br J Pharmacol **139**(8): 1441-1448.
- Giuffrida A, Parsons LH, Kerr TM, Rodriguez de Fonseca F, Navarro M y Piomelli D** (1999). "Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum." Nat Neurosci **2**(4): 358-363.
- Goodman CS y Shatz CJ** (1993). "Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity." Cell **72 Suppl**: 77-98.
- Graybiel AM** (1984). "Correspondence between the dopamine islands and striosomes of the mammalian striatum." Neuroscience **13**(4): 1157-1187.
- Graybiel AM** (2008). "Habits, rituals, and the evaluative brain." Annu Rev Neurosci **31**: 359-387.
- Graybiel AM y Rauch SL** (2000). "Toward a neurobiology of obsessive-compulsive disorder." Neuron **28**(2): 343-347.
- Groves PM, Linder JC y Young SJ** (1994). "5-hydroxydopamine-labeled dopaminergic axons: three-dimensional reconstructions of axons, synapses and postsynaptic targets in rat neostriatum." Neuroscience **58**(3): 593-604.
- Gruart A, Munoz MD y Delgado-Garcia JM** (2006). "Involvement of the CA3-CA1 synapse in the acquisition of associative learning in behaving mice." J Neurosci **26**(4): 1077-1087.

- Gubellini P, Saulle E, Centonze D, Bonsi P, Pisani A, Bernardi G, Conquet F y Calabresi P** (2001). "Selective involvement of mGlu1 receptors in corticostriatal LTD." Neuropharmacology **40**(7): 839-846.
- Haber SN** (2003). "The primate basal ganglia: parallel and integrative networks." J Chem Neuroanat **26**(4): 317-330.
- Haber SN, Fudge JL y McFarland NR** (2000). "Striatonigrostriatal pathways in primates form an ascending spiral from the shell to the dorsolateral striatum." J Neurosci **20**(6): 2369-2382.
- Haber SN, Kim KS, Maily P y Calzavara R** (2006). "Reward-related cortical inputs define a large striatal region in primates that interface with associative cortical connections, providing a substrate for incentive-based learning." J Neurosci **26**(32): 8368-8376.
- Hattori T y McGeer PL** (1973). "Synaptogenesis in the corpus striatum of infant rat." Exp Neurol **38**(1): 70-79.
- Heifets BD y Castillo PE** (2009). "Endocannabinoid signaling and long-term synaptic plasticity." Annu Rev Physiol **71**: 283-306.
- Hikosaka O, Nakahara H, Rand MK, Sakai K, Lu X, Nakamura K, Miyachi S y Doya K** (1999). "Parallel neural networks for learning sequential procedures." Trends Neurosci **22**(10): 464-471.
- Hilario MR, Clouse E, Yin HH y Costa RM** (2007). "Endocannabinoid signaling is critical for habit formation." Front Integr Neurosci **1**: 6.
- Hobson JA y Pace-Schott EF** (2002). "The cognitive neuroscience of sleep: neuronal systems, consciousness and learning." Nat Rev Neurosci **3**(9): 679-693.
- Hubel DH y Wiesel TN** (1965). "Binocular interaction in striate cortex of kittens reared with artificial squint." J Neurophysiol **28**(6): 1041-1059.
- Huber R, Ghilardi MF, Massimini M y Tononi G** (2004). "Local sleep and learning." Nature **430**(6995): 78-81.
- Huot P y Parent A** (2007). "Dopaminergic neurons intrinsic to the striatum." J Neurochem **101**(6): 1441-1447.
- Huttenlocher PR y de Courten C** (1987). "The development of synapses in striate cortex of man." Hum Neurobiol **6**(1): 1-9.
- Ikemoto S** (2007). "Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex." Brain Res Rev **56**(1): 27-78.
- Jankovic J** (2001). "Tourette's syndrome." N Engl J Med **345**(16): 1184-1192.
- Johnston MV** (2004). "Clinical disorders of brain plasticity." Brain Dev **26**(2): 73-80.

- Kasanetz F, Riquelme LA, Della-Maggiore V, O'Donnell P y Murer MG** (2008). "Functional integration across a gradient of corticostriatal channels controls UP state transitions in the dorsal striatum." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(23): 8124-8129.
- Kasanetz F, Riquelme LA y Murer MG** (2002). "Disruption of the two-state membrane potential of striatal neurones during cortical desynchronisation in anaesthetised rats." J Physiol **543**(Pt 2): 577-589.
- Kasanetz F, Riquelme LA, O'Donnell P y Murer MG** (2006). "Turning off cortical ensembles stops striatal Up states and elicits phase perturbations in cortical and striatal slow oscillations in rat in vivo." J Physiol **577**(Pt 1): 97-113.
- Kataoka Y, Kalanithi PS, Grantz H, Schwartz ML, Saper C, Leckman JF y Vaccarino FM** (2010). "Decreased number of parvalbumin and cholinergic interneurons in the striatum of individuals with Tourette syndrome." J Comp Neurol **518**(3): 277-291.
- Katz LC y Shatz CJ** (1996). "Synaptic activity and the construction of cortical circuits." Science **274**(5290): 1133-1138.
- Kerr JN y Wickens JR** (2001). "Dopamine D-1/D-5 receptor activation is required for long-term potentiation in the rat neostriatum in vitro." J Neurophysiol **85**(1): 117-124.
- Kitai ST, Sugimori M y Kocsis JD** (1976). "Excitatory nature of dopamine in the nigro-caudate pathway." Exp Brain Res **24**(4): 351-363.
- Knudsen EI** (2004). "Sensitive periods in the development of the brain and behavior." J Cogn Neurosci **16**(8): 1412-1425.
- Konradi C y Heckers S** (2001). "Antipsychotic drugs and neuroplasticity: insights into the treatment and neurobiology of schizophrenia." Biol Psychiatry **50**(10): 729-742.
- Kreitzer AC y Malenka RC** (2005). "Dopamine modulation of state-dependent endocannabinoid release and long-term depression in the striatum." J Neurosci **25**(45): 10537-10545.
- Kreitzer AC y Malenka RC** (2007). "Endocannabinoid-mediated rescue of striatal LTD and motor deficits in Parkinson's disease models." Nature **445**(7128): 643-647.
- Kreitzer AC y Malenka RC** (2008). "Striatal plasticity and basal ganglia circuit function." Neuron **60**(4): 543-554.
- Lammel S, Hetzel A, Hackel O, Jones I, Liss B y Roeper J** (2008). "Unique properties of mesoprefrontal neurons within a dual mesocorticolimbic dopamine system." Neuron **57**(5): 760-773.
- Lovinger DM** (2010). "Neurotransmitter roles in synaptic modulation, plasticity and learning in the dorsal striatum." Neuropharmacology.

- Lovinger DM, Tyler EC y Merritt A** (1993). "Short- and long-term synaptic depression in rat neostriatum." J Neurophysiol **70**(5): 1937-1949.
- Luna B** (2009). "Developmental changes in cognitive control through adolescence." Adv Child Dev Behav **37**: 233-278.
- Luthman J, Friedemann M, Bickford P, Olson L, Hoffer BJ y Gerhardt GA** (1993). "In vivo electrochemical measurements and electrophysiological studies of rat striatum following neonatal 6-hydroxydopamine treatment." Neuroscience **52**(3): 677-687.
- Mahon S, Deniau JM y Charpier S** (2001). "Relationship between EEG potentials and intracellular activity of striatal and cortico-striatal neurons: an in vivo study under different anesthetics." Cereb Cortex **11**(4): 360-373.
- Mahon S, Deniau JM y Charpier S** (2004). "Corticostriatal plasticity: life after the depression." Trends Neurosci **27**(8): 460-467.
- Mahon S, Vautrelle N, Pezard L, Slaght SJ, Deniau JM, Chouvet G y Charpier S** (2006). "Distinct patterns of striatal medium spiny neuron activity during the natural sleep-wake cycle." J Neurosci **26**(48): 12587-12595.
- Mallet N, Le Moine C, Charpier S y Gonon F** (2005). "Feedforward inhibition of projection neurons by fast-spiking GABA interneurons in the rat striatum in vivo." J Neurosci **25**(15): 3857-3869.
- Manukian KH y Kirakosian LG** (1985). "Proteolipids in developing rat brain." Neurochem Res **10**(11): 1533-1545.
- Markram H, Lubke J, Frotscher M y Sakmann B** (1997). "Regulation of synaptic efficacy by coincidence of postsynaptic APs and EPSPs." Science **275**(5297): 213-215.
- Maroun M y Richter-Levin G** (2003). "Exposure to acute stress blocks the induction of long-term potentiation of the amygdala-prefrontal cortex pathway in vivo." J Neurosci **23**(11): 4406-4409.
- Massimini M, Tononi G y Huber R** (2009). "Slow waves, synaptic plasticity and information processing: insights from transcranial magnetic stimulation and high-density EEG experiments." Eur J Neurosci **29**(9): 1761-1770.
- McCutcheon JE y Marinelli M** (2009). "Age matters." Eur J Neurosci **29**(5): 997-1014.
- Mercuri N, Bernardi G, Calabresi P, Cotugno A, Levi G y Stanzione P** (1985). "Dopamine decreases cell excitability in rat striatal neurons by pre- and postsynaptic mechanisms." Brain Res **358**(1-2): 110-121.
- Meredith GE, Ypma P y Zahm DS** (1995). "Effects of dopamine depletion on the morphology of medium spiny neurons in the shell and core of the rat nucleus accumbens." J Neurosci **15**(5 Pt 2): 3808-3820.

- Middleton FA y Strick PL** (2000). "Basal ganglia output and cognition: evidence from anatomical, behavioral, and clinical studies." Brain Cogn **42**(2): 183-200.
- Miller FE, Heffner TG, Kotake C y Seiden LS** (1981). "Magnitude and duration of hyperactivity following neonatal 6-hydroxydopamine is related to the extent of brain dopamine depletion." Brain Res **229**(1): 123-132.
- Mink JW** (2001). "Basal ganglia dysfunction in Tourette's syndrome: a new hypothesis." Pediatr Neurol **25**(3): 190-198.
- Moy SS** (1995). "Impaired acquisition and operant responding after neonatal dopamine depletion in rats." Pharmacol Biochem Behav **52**(2): 433-441.
- Napier TC, Coyle S y Breese GR** (1985). "Ontogeny of striatal unit activity and effects of single or repeated haloperidol administration in rats." Brain Res **333**(1): 35-44.
- Nemirovsky SI, Avale ME, Brunner D y Rubinstein M** (2009). "Reward-seeking and discrimination deficits displayed by hypodopaminergic mice are prevented in mice lacking dopamine D4 receptors." Synapse **63**(11): 991-997.
- Nigg JT** (2001). "Is ADHD a disinhibitory disorder?" Psychol Bull **127**(5): 571-598.
- Nisenbaum LK, Webster SM, Chang SL, McQueeney KD y LoTurco JJ** (1998). "Early patterning of prelimbic cortical axons to the striatal patch compartment in the neonatal mouse." Dev Neurosci **20**(2-3): 113-124.
- Nomura Y y Segawa M** (2003). "Neurology of Tourette's syndrome (TS) TS as a developmental dopamine disorder: a hypothesis." Brain Dev **25 Suppl 1**: S37-42.
- Nyakas C y Van Delft AM** (1975). "Behavioral and electrocortical activity in rats after neonatal intraventricular 6-hydroxydopamine administration." Pharmacol Biochem Behav **3**(2): 271-277.
- O'Donnell P y Grace AA** (1995). "Synaptic interactions among excitatory afferents to nucleus accumbens neurons: hippocampal gating of prefrontal cortical input." J Neurosci **15**(5 Pt 1): 3622-3639.
- O'Donnell P, Greene J, Pabello N, Lewis BL y Grace AA** (1999). "Modulation of cell firing in the nucleus accumbens." Ann N Y Acad Sci **877**: 157-175.
- O'Donnell P, Lewis BL, Weinberger DR y Lipska BK** (2002). "Neonatal hippocampal damage alters electrophysiological properties of prefrontal cortical neurons in adult rats." Cereb Cortex **12**(9): 975-982.
- Onn SP, Balzer JR, Sidney JP, Stricker EM, Zigmond MJ y Berger TW** (1990). "Lesions of the dopaminergic nigrostriatal system in neonatal rats: effects on the electrophysiological activity of striatal neurons recorded during adulthood." Brain Res **518**(1-2): 274-278.

- Partridge JG, Tang KC y Lovinger DM** (2000). "Regional and postnatal heterogeneity of activity-dependent long-term changes in synaptic efficacy in the dorsal striatum." J Neurophysiol **84**(3): 1422-1429.
- Paus T, Keshavan M y Giedd JN** (2008). "Why do many psychiatric disorders emerge during adolescence?" Nat Rev Neurosci **9**(12): 947-957.
- Pawlak V y Kerr JN** (2008). "Dopamine receptor activation is required for corticostriatal spike-timing-dependent plasticity." J Neurosci **28**(10): 2435-2446.
- Paxinos G y Franklin KBJ** (2001). The mouse brain in stereotaxic coordinates. San Diego, Academic Press.
- Penn AA y Shatz CJ** (1999). "Brain waves and brain wiring: the role of endogenous and sensory-driven neural activity in development." Pediatr Res **45**(4 Pt 1): 447-458.
- Pezzi S, Checa N y Alberch J** (2005). "The vulnerability of striatal projection neurons and interneurons to excitotoxicity is differentially regulated by dopamine during development." Int J Dev Neurosci **23**(4): 343-349.
- Plotkin JL, Wu N, Chesselet MF y Levine MS** (2005). "Functional and molecular development of striatal fast-spiking GABAergic interneurons and their cortical inputs." Eur J Neurosci **22**(5): 1097-1108.
- Raichle ME** (2006). "Neuroscience. The brain's dark energy." Science **314**(5803): 1249-1250.
- Rebec GV** (2006). "Behavioral electrophysiology of psychostimulants." Neuropsychopharmacology **31**(11): 2341-2348.
- Redgrave P, Prescott TJ y Gurney K** (1999). "The basal ganglia: a vertebrate solution to the selection problem?" Neuroscience **89**(4): 1009-1023.
- Reynolds JN y Wickens JR** (2000). "Substantia nigra dopamine regulates synaptic plasticity and membrane potential fluctuations in the rat neostriatum, in vivo." Neuroscience **99**(2): 199-203.
- Rodier PM** (1994). "Vulnerable periods and processes during central nervous system development." Environ Health Perspect **102 Suppl 2**: 121-124.
- Rolls ET, Thorpe SJ, Boytim M, Szabo I y Perrett DI** (1984). "Responses of striatal neurons in the behaving monkey. 3. Effects of iontophoretically applied dopamine on normal responsiveness." Neuroscience **12**(4): 1201-1212.
- Rothman RB y Baumann MH** (2003). "Monoamine transporters and psychostimulant drugs." Eur J Pharmacol **479**(1-3): 23-40.
- Rowe DC, Stever C, Giedinghagen LN, Gard JM, Cleveland HH, Terris ST, Mohr JH, Sherman S, Abramowitz A y Waldman ID** (1998). "Dopamine DRD4 receptor polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder." Mol Psychiatry **3**(5): 419-426.

- Rubia K, Halari R, Cubillo A, Mohammad AM, Brammer M y Taylor E** (2009). "Methylphenidate normalises activation and functional connectivity deficits in attention and motivation networks in medication-naive children with ADHD during a rewarded continuous performance task." Neuropharmacology **57**(7-8): 640-652.
- Russell VA, Sagvolden T y Johansen EB** (2005). "Animal models of attention-deficit hyperactivity disorder." Behav Brain Funct **1**: 9.
- Ryan LJ, Tepper JM, Young SJ y Groves PM** (1985). "Amphetamine's effects on terminal excitability of noradrenergic locus coeruleus neurons are impulse-dependent at low but not high doses." Brain Res **341**(1): 155-163.
- Sagvolden T, Johansen EB, Aase H y Russell VA** (2005a). "A dynamic developmental theory of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) predominantly hyperactive/impulsive and combined subtypes." Behav Brain Sci **28**(3): 397-419; discussion 419-368.
- Sagvolden T, Russell VA, Aase H, Johansen EB y Farshbaf M** (2005b). "Rodent models of attention-deficit/hyperactivity disorder." Biol Psychiatry **57**(11): 1239-1247.
- Schlosser B, Klaus G, Prime G y Ten Bruggencate G** (1999). "Postnatal development of calretinin- and parvalbumin-positive interneurons in the rat neostriatum: an immunohistochemical study." J Comp Neurol **405**(2): 185-198.
- Schmidt U, Beyer C, Oestreicher AB, Reisert I, Schilling K y Pilgrim C** (1996). "Activation of dopaminergic D1 receptors promotes morphogenesis of developing striatal neurons." Neuroscience **74**(2): 453-460.
- Schultz W** (2002). "Getting formal with dopamine and reward." Neuron **36**(2): 241-263.
- Schultz W, Apicella P y Ljungberg T** (1993). "Responses of monkey dopamine neurons to reward and conditioned stimuli during successive steps of learning a delayed response task." J Neurosci **13**(3): 900-913.
- Schultz W y Romo R** (1992). "Role of primate basal ganglia and frontal cortex in the internal generation of movements. I. Preparatory activity in the anterior striatum." Exp Brain Res **91**(3): 363-384.
- Sharpe NA y Tepper JM** (1998). "Postnatal development of excitatory synaptic input to the rat neostriatum: an electron microscopic study." Neuroscience **84**(4): 1163-1175.
- Shaywitz BA, Klopper JH y Gordon JW** (1978). "Methylphenidate in 6-hydroxydopamine-treated developing rat pups. Effects on activity and maze performance." Arch Neurol **35**(7): 463-469.
- Shaywitz BA, Klopper JH, Yager RD y Gordon JW** (1976b). "Paradoxical response to amphetamine in developing rats treated with 6-hydroxydopamine." Nature **261**(5556): 153-155.
- Shaywitz BA, Yager RD y Klopper JH** (1976a). "Selective brain dopamine depletion in developing rats: an experimental model of minimal brain dysfunction." Science **191**(4224): 305-308.

- Shen W, Flajolet M, Greengard P y Surmeier DJ** (2008). "Dichotomous dopaminergic control of striatal synaptic plasticity." Science **321**(5890): 848-851.
- Siapas AG, Lubenov EV y Wilson MA** (2005). "Prefrontal phase locking to hippocampal theta oscillations." Neuron **46**(1): 141-151.
- Sills TL, Greenshaw AJ, Baker GB y Fletcher PJ** (1999). "Acute fluoxetine treatment potentiates amphetamine hyperactivity and amphetamine-induced nucleus accumbens dopamine release: possible pharmacokinetic interaction." Psychopharmacology (Berl) **141**(4): 421-427.
- Singla S, Kreitzer AC y Malenka RC** (2007). "Mechanisms for synapse specificity during striatal long-term depression." J Neurosci **27**(19): 5260-5264.
- Smith GS, Schloesser R, Brodie JD, Dewey SL, Logan J, Vitkun SA, Simkowitz P, Hurley A, Cooper T, Volkow ND y Cancro R** (1998). "Glutamate modulation of dopamine measured in vivo with positron emission tomography (PET) and 11C-raclopride in normal human subjects." Neuropsychopharmacology **18**(1): 18-25.
- Snyder-Keller AM** (1991). "Development of striatal compartmentalization following pre- or postnatal dopamine depletion." J Neurosci **11**(3): 810-821.
- Soiza-Reilly M y Azcurra JM** (2009). "Developmental striatal critical period of activity-dependent plasticity is also a window of susceptibility for haloperidol induced adult motor alterations." Neurotoxicol Teratol **31**(4): 191-197.
- Spear LP** (2000). "The adolescent brain and age-related behavioral manifestations." Neurosci Biobehav Rev **24**(4): 417-463.
- Stanwood GD y Levitt P** (2004). "Drug exposure early in life: functional repercussions of changing neuropharmacology during sensitive periods of brain development." Curr Opin Pharmacol **4**(1): 65-71.
- Steriade M** (2000). "Corticothalamic resonance, states of vigilance and mentation." Neuroscience **101**(2): 243-276.
- Stickgold R, Hobson JA, Fosse R y Fosse M** (2001). "Sleep, learning, and dreams: off-line memory reprocessing." Science **294**(5544): 1052-1057.
- Stoetzner CR, Pettibone JR y Berke JD** (2010). "State-dependent plasticity of the corticostriatal pathway." Neuroscience **165**(4): 1013-1018.
- Suaud-Chagny MF, Chergui K, Chouvet G y Gonon F** (1992). "Relationship between dopamine release in the rat nucleus accumbens and the discharge activity of dopaminergic neurons during local in vivo application of amino acids in the ventral tegmental area." Neuroscience **49**(1): 63-72.
- Sung KW, Choi S y Lovinger DM** (2001). "Activation of group I mGluRs is necessary for induction of long-term depression at striatal synapses." J Neurophysiol **86**(5): 2405-2412.

- Sur M y Rubenstein JL** (2005). "Patterning and plasticity of the cerebral cortex." Science **310**(5749): 805-810.
- Surmeier DJ, Plotkin J y Shen W** (2009). "Dopamine and synaptic plasticity in dorsal striatal circuits controlling action selection." Curr Opin Neurobiol **19**(6): 621-628.
- Swanson JM, Kinsbourne M, Nigg J, Lanphear B, Stefanatos GA, Volkow N, Taylor E, Casey BJ, Castellanos FX y Wadhwa PD** (2007). "Etiologic subtypes of attention-deficit/hyperactivity disorder: brain imaging, molecular genetic and environmental factors and the dopamine hypothesis." Neuropsychol Rev **17**(1): 39-59.
- Swanson JM y Volkow ND** (2002). "Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of stimulants: implications for the design of new treatments for ADHD." Behav Brain Res **130**(1-2): 73-78.
- Tang K, Low MJ, Grandy DK y Lovinger DM** (2001). "Dopamine-dependent synaptic plasticity in striatum during in vivo development." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(3): 1255-1260.
- Tang KC y Lovinger DM** (2000). "Role of pertussis toxin-sensitive G-proteins in synaptic transmission and plasticity at corticostriatal synapses." J Neurophysiol **83**(1): 60-69.
- Tarazi FI y Baldessarini RJ** (2000). "Comparative postnatal development of dopamine D(1), D(2) and D(4) receptors in rat forebrain." Int J Dev Neurosci **18**(1): 29-37.
- Tepper JM, Koos T y Wilson CJ** (2004). "GABAergic microcircuits in the neostriatum." Trends Neurosci **27**(11): 662-669.
- Tepper JM, Sharpe NA, Koos TZ y Trent F** (1998). "Postnatal development of the rat neostriatum: electrophysiological, light- and electron-microscopic studies." Dev Neurosci **20**(2-3): 125-145.
- Toft PB** (1999). "Prenatal and perinatal striatal injury: a hypothetical cause of attention-deficit-hyperactivity disorder?" Pediatr Neurol **21**(3): 602-610.
- Toni N, Buchs PA, Nikonenko I, Bron CR y Muller D** (1999). "LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite." Nature **402**(6760): 421-425.
- Torregrossa MM, Quinn JJ y Taylor JR** (2008). "Impulsivity, compulsivity, and habit: the role of orbitofrontal cortex revisited." Biol Psychiatry **63**(3): 253-255.
- Towle AC, Criswell HE, Maynard EH, Lauder JM, Joh TH, Mueller RA y Breese GR** (1989). "Serotonergic innervation of the rat caudate following a neonatal 6-hydroxydopamine lesion: an anatomical, biochemical and pharmacological study." Pharmacol Biochem Behav **34**(2): 367-374.
- Tseng KY, Kasanetz F, Kargieman L, Riquelme LA y Murer MG** (2001). "Cortical slow oscillatory activity is reflected in the membrane potential and spike trains of striatal neurons in rats with chronic nigrostriatal lesions." J Neurosci **21**(16): 6430-6439.

- Tseng KY y O'Donnell P** (2005). "Post-pubertal emergence of prefrontal cortical up states induced by D1-NMDA co-activation." Cereb Cortex **15**(1): 49-57.
- Ungerstedt U** (1971). "Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system." Acta Physiol Scand Suppl **367**: 95-122.
- van der Kooij MA y Glennon JC** (2007). "Animal models concerning the role of dopamine in attention-deficit hyperactivity disorder." Neurosci Biobehav Rev **31**(4): 597-618.
- Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS y Ding YS** (2005). "Imaging the effects of methylphenidate on brain dopamine: new model on its therapeutic actions for attention-deficit/hyperactivity disorder." Biol Psychiatry **57**(11): 1410-1415.
- Volkow ND, Wang GJ, Kollins SH, Wigal TL, Newcorn JH, Telang F, Fowler JS, Zhu W, Logan J, Ma Y, Pradhan K, Wong C y Swanson JM** (2009). "Evaluating dopamine reward pathway in ADHD: clinical implications." JAMA **302**(10): 1084-1091.
- Voorn P, Kalsbeek A, Jorritsma-Byham B y Groenewegen HJ** (1988). "The pre- and postnatal development of the dopaminergic cell groups in the ventral mesencephalon and the dopaminergic innervation of the striatum of the rat." Neuroscience **25**(3): 857-887.
- Voorn P, Vanderschuren LJ, Groenewegen HJ, Robbins TW y Pennartz CM** (2004). "Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum." Trends Neurosci **27**(8): 468-474.
- Wahlstrom D, White T y Luciana M** (2010). "Neurobehavioral evidence for changes in dopamine system activity during adolescence." Neurosci Biobehav Rev **34**(5): 631-648.
- Walsh JP** (1993). "Depression of excitatory synaptic input in rat striatal neurons." Brain Res **608**(1): 123-128.
- Wang M, Ramos BP, Paspalas CD, Shu Y, Simen A, Duque A, Vijayraghavan S, Brennan A, Dudley A, Nou E, Mazer JA, McCormick DA y Arnsten AF** (2007). "Alpha2A-adrenoceptors strengthen working memory networks by inhibiting cAMP-HCN channel signaling in prefrontal cortex." Cell **129**(2): 397-410.
- Watson RE, Desesso JM, Hurtt ME y Cappon GD** (2006). "Postnatal growth and morphological development of the brain: a species comparison." Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol **77**(5): 471-484.
- Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG y Bear MF** (2006). "Learning induces long-term potentiation in the hippocampus." Science **313**(5790): 1093-1097.
- Wickens JR** (2009). "Synaptic plasticity in the basal ganglia." Behav Brain Res **199**(1): 119-128.
- Wickens JR, Begg AJ y Arbuthnott GW** (1996). "Dopamine reverses the depression of rat corticostriatal synapses which normally follows high-frequency stimulation of cortex in vitro." Neuroscience **70**(1): 1-5.

- Wilkinson LS, Mittleman G, Torres E, Humby T, Hall FS y Robbins TW** (1993). "Enhancement of amphetamine-induced locomotor activity and dopamine release in nucleus accumbens following excitotoxic lesions of the hippocampus." Behav Brain Res **55**(2): 143-150.
- Wilson CJ** (1993). "The generation of natural firing patterns in neostriatal neurons." Prog Brain Res **99**: 277-297.
- Wilson CJ y Groves PM** (1981). "Spontaneous firing patterns of identified spiny neurons in the rat neostriatum." Brain Res **220**(1): 67-80.
- Wilson CJ, Mastrorarde DN, McEwen B y Frank J** (1992). "Measurement of neuronal surface area using high-voltage electron microscope tomography." Neuroimage **1**(1): 11-22.
- Woo TU y Crowell AL** (2005). "Targeting synapses and myelin in the prevention of schizophrenia." Schizophr Res **73**(2-3): 193-207.
- Yin HH y Knowlton BJ** (2006). "The role of the basal ganglia in habit formation." Nat Rev Neurosci **7**(6): 464-476.
- Yin HH, Knowlton BJ y Balleine BW** (2005). "Blockade of NMDA receptors in the dorsomedial striatum prevents action-outcome learning in instrumental conditioning." Eur J Neurosci **22**(2): 505-512.
- Yin HH y Lovinger DM** (2006). "Frequency-specific and D2 receptor-mediated inhibition of glutamate release by retrograde endocannabinoid signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(21): 8251-8256.
- Yin HH, Mulcare SP, Hilario MR, Clouse E, Holloway T, Davis MI, Hansson AC, Lovinger DM y Costa RM** (2009). "Dynamic reorganization of striatal circuits during the acquisition and consolidation of a skill." Nat Neurosci **12**(3): 333-341.
- Yin HH, Ostlund SB y Balleine BW** (2008). "Reward-guided learning beyond dopamine in the nucleus accumbens: the integrative functions of cortico-basal ganglia networks." Eur J Neurosci **28**(8): 1437-1448.
- Yuste R** (1997). "Introduction: spontaneous activity in the developing central nervous system." Semin Cell Dev Biol **8**(1): 1-4.
- Zheng T y Wilson CJ** (2002). "Corticostriatal combinatorics: the implications of corticostriatal axonal arborizations." J Neurophysiol **87**(2): 1007-1017.
- Zold CL, Ballion B, Riquelme LA, Gonon F y Murer MG** (2007). "Nigrostriatal lesion induces D2-modulated phase-locked activity in the basal ganglia of rats." Eur J Neurosci **25**(7): 2131-2144.